



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**223 462 B1**

- (21) A bejelentés ügyszáma: 4730/90  
(22) A bejelentés napja: 1990. 06. 07.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
07/492,462 1990. 03. 07. US  
07/362,901 1989. 06. 07. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/NL 90/00081  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 90/15070

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**C 07 K 1/04**  
B 01 J 19/00  
C 07 K 17/06  
C 07 K 17/14

- (40) A közzététel napja: 1992. 07. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2004. 07. 28.

(72) Feltalálók:

Fodor, Stephen P. A., Palo Alto, Kalifornia (US)  
Pirrung, Michael C., Durham, North Carolina  
(US)  
Read, J. Leighton, Palo Alto, Kalifornia (US)  
Stryer, Lubert, Stanford, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

Affymetrix Inc., Santa Clara, Kalifornia (US)

(74) Képviseelő:

Schläfer László, DANUBIA Szabadalmi és Véd-  
jegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Eljárás immobilizált peptid- és oligonukleotid-szintézis megvalósítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás meghatározott szekvenciák-  
nak valamely hordozó adott helyén történő előállításá-  
ra. A hordozó meghatározott helyeit szelektíven besugá-  
rozva a kötésre alkalmas anyagot aktiválják. A hordozó-  
hoz ezután hozzákötik az első anyagot. A második kije-

lőtt helyet ezután besugározzák, és hozzákötik a máso-  
dik anyagot. A hordozó szelektív besugárzásával és kü-  
lönböző anyagok alkalmazásával változatos szekvencia  
alakítható ki.

A találmány anyagoknak adott helyzetben történő szintézisére és elhelyezésére vonatkozik. A találmány tárgya közelebről egyrészt eljárás és ehhez kapcsolódó készülék különböző kémiai szekvenciáknak valamely hordozó felületének meghatározott helyein történő előállítására. A találmány alkalmazható például peptidok vagy oligonukleotidok előállítására, elsősorban a biológiai aktivitás vizsgálatára alkalmas különböző kémiai anyagok előállítására.

A biológiai rendszerek tanulmányozásának alapvető felismerése, hogy egy molekula szerkezete összefügg annak aktivitásával. A szerkezet/aktivitás összefüggés fontos szerepet játszik például az enzimek funkciójának, sejtek egymás közötti kommunikációjának, valamint a celluláris szabályozás és visszacsatolási rendszer megértésében.

Egyes makromolekulákról ismert, hogy kölcsönhatásba lépnek és hozzákötődnek olyan molekulákhoz, amelyek nagyon specifikus háromdimenziális térbeli és elektroneloszlással rendelkeznek. A fenti tulajdonsággal rendelkező minden nagy kiterjedésű molekula receptornak tekinthető, függetlenül attól, hogy az egy enzim, amely egy metabolit intermedier hidrolízisét katalizálja, vagy egy sejtfelületi fehérje, amely ionok membrántranszportját közvetíti, vagy egy glikoprotein, amely a szomszédságában lévő különleges sejt azonosítására szolgál, vagy a plazmában keringő IgG típusú antitest, vagy a magban lévő DNS oligonukleotidszekvenciája. A receptorok által szelektíven megkötött különböző molekulákat ligandumnak hívják.

Különböző vizsgálatok léteznek az ismert receptorok és ligandumok közötti kötési affinitás mérésére, de a szolgáltatott információt gyakran korlátozza a hozzáférhető ligandumok száma és típusa. Időnként új ligandumokat találnak, például a molekulaszerkezet felderítésére szolgáló új technikákkal, így a röntgensugárkrisztallográfiás analízissel, és a fehérjékre kifejlesztett rekombináns géntechnológiával.

A kisméretű peptidok előnyösen alkalmazhatók a biológiában a szerkezet és a funkció közötti összefüggés felderítésére. A peptid egy aminosavszekvencia. Ha egy polimer molekulában a 20 darab esszenciális aminosav kapcsolódik össze, akkor háromdimenziális konfigurációk széles variációja képződik, amelyek mindegyike egy adott aminosavszekvenciából és oldódási körülményekből származik. A 20 esszenciális aminosavból kialakított pentapeptidok lehetséges száma például  $20^5$ , vagyis 3,2 millió különböző peptid. Annak a valószínűségét, hogy az ilyen méretű molekulák felhasználhatók a receptorkötési helyek tanulmányozásában, az epitópanalízisvizsgálatok támasztják alá, amelyek kimutatják, hogy bizonyos antitestek nagy specifikussággal ismernek fel olyan rövid szekvenciákat, amelyek csupán néhány aminosavból állnak. Emellett, az aminosavak átlagos móltömege alapján a kisméretű peptidok a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerhatóanyagok mérettartományába esnek.

A gyógyszerhatóanyagok kifejlesztése a kutatásnak ahhoz a területéhez tartozik, amely kapcsolódik a szerkezet/aktivitás összefüggés tanulmányozásához. A je-

lenlegi gyógyszerkutatás a legtöbb esetben olyan új ligandumok felfedezésének tekinthető, amelyek a biológiailag fontos receptorokhoz megfelelő specifikussággal kötődnek. További példaként a mezőgazdaságban alkalmazható új vegyületek, így peszticidok és herbicidok kidolgozása említhető.

Egy adott ligandum racionális előállítására alkalmas eljárás kidolgozása néha bonyolult és költséges. A különböző polimerek nagy tételben történő előállítására korábban alkalmazott eljárások kinosan lelassulnak, ha hatékony rendszeres vagy véletlenszerű vizsgálathoz szükséges mennyiséget kell előállítani. Így például, a Merrifield-módszert [J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2154 (1963)] peptidok szilárd hordozón történő előállítására alkalmazzák. A Merrifield-módszerben egy aminosavat kovalens kötéssel valamely oldhatatlan polimerből kialakított hordozóanyagra kötnek. A következő,  $\alpha$ -védőcsoporttal ellátott aminosavat a kovalens kötéssel rögzített aminosavval reagáltatva dipeptidet alakítanak ki. Mosás után a védőcsoportot eltávolítják, és egy harmadik, szintén  $\alpha$ -védőcsoporttal ellátott aminosavat adnak a dipeptidhez. Ezt a folyamatot a kívánt hosszúságú és szekvenciájú peptid előállításáig folytatják. A Merrifield-módszerral naponta csak egy maroknyi peptidszekvenciát lehet gazdaságosan előállítani.

Polimer szekvenciák nagy tételben történő előállításához javasolták több polimerszintetizáló reaktor együttes felhasználását. Így például, egy cső alakú reaktorrendszer alkalmazható lineáris polimernek szilárd fázisú hordozón történő előállítására a reagensek automatikus hozzáadásával. Ez a megoldás sem teszi azonban lehetővé nagy mennyiségű polimer szekvenciák megfelelően gazdaságos előállítását.

Polimer szekvenciák nagy tételben történő előállítására ismert továbbá egy olyan módszer, amelyben egy perforált tartóedényben ismert mennyiségű reagens van elhelyezve, amelyek mérete nagyobb, mint a tartóedény perforációja. A tartóedényt szelektíven reagáltatják a kívánt anyagokkal, és így szintetizálják a kívánt szekvenciát. A többi ismert eljáráshoz hasonlóan, ez a megoldás sem biztosítja a polipeptidok hatékony vizsgálatához szükséges mennyiség gyakorlati előállítását.

A fentiekén kívül más megoldásokat is leírtak. Ilyen például, amelynek során a peptidet 96 darab műanyag tűn szintetizálják, amely a standard mikrotitrálólemez kialakításához illeszkedik. Bár ezek a technikák bizonyos mértékben alkalmazhatók, lényeges hátrányokkal is járnak. Az egyik ilyen hátrány, hogy továbbra is korlátozva van a szekvenciáknak az a változatossága, amely gazdaságosan előállítható és vizsgálható.

A fentiekből látható, hogy szükség van olyan új eljárás és készülék kidolgozására, amely lehetővé teszi különböző kémiai szekvenciák adott helyzetben történő előállítását.

Az US 4.562.157 számú irat biokémiai ligandumot tartalmazó diagnosztikai eszközt ismertet, amelyben biokémiai anyagok kapcsolódnak egy szenzor felületéhez. Ennek kialakításához a biokémiai anyagot, így antitestet vagy antigént a felület egy meghatározott szakaszához kell kapcsolni. Ehhez a felülethez kovalens kötéssel foto-

kémiai úton aktiválható funkciós csoportot kötnek, amit a felület meghatározott szakaszaira kiterjedő besugárzással aktiválnak, és az aktivált funkciós csoportot a biokémiai anyaggal reagáltatják.

Ebben a megoldásban tehát a kész biokémiai anyagot kötik meg egy hordozó felületének meghatározott szakaszán, ahol a biokémiai anyag általában valamely polipeptid. A szóban forgó polipeptid előállításával nem foglalkozik.

A találmány tárgya javított eljárás és berendezés nagyszámú különféle polipeptid aminosavakból, valamint oligonukleotid nukleotidokból lépésenkénti szintézissel történő előállítására és azonosítására egy hordozó meghatározott részfelületein oly módon, hogy az alábbi lépéseket hajtjuk végre:

a hordozó egyik, fénysugárzással eltávolítható védőcsoportokkal védett funkciós csoportokkal ellátott felületének egy első meghatározott részfelületét besugározva eltávolítjuk a védőcsoportokat;

a felületet egy első aminosavval vagy nukleotiddal érintkeztetve az aminosavat vagy nukleotidot az első meghatározott részfelületen található funkciós csoportokhoz kapcsoljuk, ahol az aminosav vagy nukleotid fénysugárzással eltávolítható védőcsoporttal védett funkciós csoporttal rendelkezik;

a hordozó egyik felületének egy második meghatározott részfelületét besugározva eltávolítjuk a védőcsoportokat, ahol a második meghatározott részfelület az első meghatározott részfelülettel azonos vagy attól eltérő;

a felületet egy második aminosavval vagy nukleotiddal érintkeztetve az aminosavat vagy nukleotidot a második meghatározott részfelületen található funkciós csoportokhoz kapcsoljuk, ahol a második aminosav vagy nukleotid az első aminosavval vagy nukleotiddal azonos vagy attól eltérő, és fénysugárzással eltávolítható védőcsoporttal védett funkciós csoporttal rendelkezik;

majd további besugárzási és aminosavval vagy nukleotiddal történő érintkeztetési és kapcsolási lépéseket végzünk a kívánt nagyszámú különféle polipeptid vagy oligonukleotid kialakításáig, melynek során az első meghatározott részfelület és a második meghatározott részfelület közül legalább egyet és legalább részben besugárzunk a további érintkeztetési és kapcsolási lépések legalább egyikében, ahol a polipeptidek vagy oligonukleotidok az említett felületen helyezkednek el, és a besugárzási lépések során kialakított besugárzási minta, valamint az érintkeztetési és kapcsolási lépések során megkötött egyedi aminosavak vagy nukleotidok által definiált szekvenciával rendelkeznek, azzal a megszorítással, hogy az egyes szekvenciákban található terminális aminosavak vagy nukleotidok fénysugárzásnak ellenálló védőcsoportot hordoznak,

majd a biológiailag hatásos polipeptid(ek)et vagy oligonukleotid(ok)at azonosítjuk.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint egy hordozón kapcsolómolekulákat alakítunk ki. A kapcsolómolekulák egyik terminális vége reakcióképes funkciós csoporttal van ellátva, amit fotokémiaiilag eltávolítható védőcsoporttal blokkolunk. Litográfiai módszerek alkalmazása mellett a fotokémiaiilag eltávolítható védő-

csoportot fény hatásának tesszük ki, és egy első kiválasztott részfelületen eltávolítjuk a kapcsolómolekuláról. A hordozót ezután mossuk, vagy más módon egy első monomerrel érintkeztetjük, amely reagál a kapcsolómolekulán lévő funkciós csoportokkal. Monomerként előnyösen aminosavat alkalmazunk, amely aminosav vagy karboxiterminális végén fotokémiaiilag eltávolítható védőcsoportot tartalmaz, és ezt előnyösen olyan kapcsolómolekulával reagáltatjuk, amely fotokémiaiilag eltávolítható védőcsoportot hordozó aminosav vagy karbon-savcsoportra végződik.

A kiválasztott részfelületek egy második sorozatát ezután fény hatásának tesszük ki, és a kapcsolómolekula, valamint a védett aminosav fotokémiaiilag eltávolítható védőcsoportját a második részfelületen eltávolítjuk. A hordozót ezután fotokémiaiilag eltávolítható védőcsoportot hordozó második monomerrel érintkeztetjük, amely a funkciós csoportokkal reagál. Ezt a folyamatot a monomerek szelektív alkalmazása mellett a kívánt hosszúságú és kívánt kémiai szekvenciájú polipeptid előállításáig ismételtjük. A fotokémiai szempontból labilis csoportokat ezután kívánt esetben eltávolítjuk, és a szekvenciát kívánt esetben lezárjuk. Az adott esetben jelen lévő oldallánci védőcsoportokat szintén eltávolítjuk.

A találmány szerinti megoldás felhasználható továbbá oligonukleotidok előállítására, amikor is monomerként nukleotidokat alkalmazunk.

Az említett litográfiai módszer lehetővé teszi, hogy a fényt a hordozón viszonylag kis kiterjedésű és pontosan meghatározott helyre irányítsuk. Ezáltal lehetővé válik ismert kémiai szekvenciájú polimernek a hordozó ismert helyén történő előállítása.

A kapott hordozó különböző célokra, például nagyszámú polimer biológiai aktivitásának vizsgálatára felhasználható. A biológiai aktivitás vizsgálatához a hordozót egy vagy több receptorral, így egész sejt antitesttel, hólyagocskán elhelyezkedő receptorral, lipiddel vagy bármely más receptorral kezeljük. A receptort előnyösen például fluoreszcens markerrel, radioaktív markerrel vagy a receptorral reakcióképes jelölt antitesttel jelöljük. A markernek a hordozón történő elhelyezkedését például fotondetektálással vagy autoradiográfiai módszerrel mutatjuk ki. Az adott helyzetben kötött anyag szekvenciájának ismeretében gyorsan meghatározhatjuk, hogy melyik szekvencia kötődik a receptorhoz, és ezáltal az eljárás nagyszámú polimer vizsgálatára alkalmazható. A találmány szerinti megoldás alkalmazható továbbá diagnosztikai célokra is, amelynek során egy adott receptorra vonatkozó különböző antitesteket kötünk meg a hordozón, és így például vérszérumban vizsgáljuk az immunrendszer hiányosságait. A találmány szerinti megoldás további felhasználási területe lehet például szerves anyagok szelektív „doppingolása” félévezető eszközökben vagy hasonlóknak.

A találmány kiterjed a polimerek szintetizálására alkalmas javított reaktorrendszerre. A reaktorrendszer magában foglal egy hordozótartót, amely a felszínén rögzíti a hordozót. A hordozótartó biztosítja továbbá a hordozó és a tartó között elhelyezkedő reaktorteret, amelyen keresztül vagy amelybe a reakcióelegyet ára-

moltatjuk. A hordozón egy maszk van elhelyezve, illetve a hordozóra egy maszk irányul, amely úgy van megvilágítva, hogy a hordozó kiválasztott részfelületeit feltárja a reaktortérben. Egy monomert pumpálunk a reaktortéren keresztül vagy más módon érintkeztetjük a hordozóval, és reagáltatjuk a feltárt részfelületekkel. A hordozó részfelületeinek szelektív feltárásával és előre meghatározott monomereknek a reaktortéren történő átáramoltatásával adott helyzetben a kívánt polimert tudjuk előállítani.

A találmány szerint előállított polimereket egy javított detektorkészülékkel és detektálási eljárással vizsgáljuk. A detektálási eljárás és készülék felületének ismert helyein nagyszámú polimer szekvenciát tartalmazó hordozót alkalmaz. A hordozót fluoreszcens jelölésű receptorral kezeljük, amely egy vagy több polimer szekvenciát megköt. A hordozót mikroszkóp-detektorkészülékbe helyezük, és azonosítjuk azokat a helyeket, ahol a kötés létrejött. A mikroszkóp-detektorkészülék magában foglal egy monokromatikus vagy polikromatikus fényforrást, amely a hordozóra fényt irányít, valamint a hordozóból származó fluoreszcens fény detektálására alkalmas eszközt, és a fluoreszcens fény elhelyezkedésének meghatározására alkalmas eszközt. A hordozóból származó fluoreszcens fény detektálására alkalmas eszköz lehet például egy fotonszámláló. A fluoreszcens fény elhelyezkedésének meghatározására alkalmas eszköz lehet például a hordozóra érvényes x/y translációs táblázat. A táblázat és adatgyűjtemény translációját megfelelően programozott digitális komputerrel rögzítjük, és dolgozzuk fel.

Az 1. ábra a hordozó lefedését és első részfelületének besugárzását mutatja. A hordozót keresztmetszetben ábrázoljuk.

A 2. ábra a hordozót mutatja az A monomer alkalmazása után.

A 3. ábra a hordozó második részfelületének besugárzását mutatja.

A 4. ábra a hordozót mutatja a B monomerrel történő kezelés után.

Az 5. ábra az A monomer besugárzását mutatja.

A 6. ábra a hordozót mutatja a B monomer második alkalmazása után.

A 7. ábra a teljes hordozót mutatja.

A 8A. és 8B. ábra különböző polimereknek hordozón történő előállítására alkalmas reaktorrendszer kialakítási módjait ismerteti.

A 9. ábra a fluoreszcens markernek a hordozón történő lokalizálására alkalmas detektorkészüléket mutatja.

A 10A–10M. ábra az A és B monomerekből kialakított trimer előállítását ismerteti.

A 11A., 11B. és 11C. ábra standard fluoreszcens gyöngyök fluoreszcens sugárzását mutatja.

A 12A. és 12B. ábra az exponálatlan és exponált NVOC lemezek fluoreszcensgörbéjét mutatja.

A 13A. és 13B. ábra a jelölt Herz antitesttel kezelt YGGFL és GGFL-re vonatkozó táblával ellátott lemez kialakítását mutatja.

A 14A. és 14B. ábra két különböző üveglemezen szintetizált tizenhat szekvencia térképét mutatja.

A leírás keretein belül a következő kifejezéseket az alábbi értelmezésben alkalmazzuk:

#### 1. Komplementer

A ligandummolekula és a hozzá tartozó receptor egymással kölcsönhatásba lépő felületének topológiai kompatibilitására vagy illeszkedésére utal. Ennek megfelelően komplementernek tekinthető a receptor és ligandumja, valamint egymással komplementerek az érintkező felületek jellemzői.

#### 2. Epitóp

Az antigén molekulának az a szakasza, amelyet a molekulának a receptorok antitestként ismert alosztályával kölcsönhatásba lépő területe határoz meg.

#### 3. Ligandum

A ligandum olyan molekula, amely egy adott receptort ismer fel. A ligandum lehet például valamely sejtmembrán receptorra, toxinra és méregre, vírus epitópra, hormonra (például opiátra vagy szteroidra), hormonreceptorra, peptidre, enzimre, enzimszubsztrátumra, kofaktorra, gyógyszerhatóanyagra, lektinre, cukorra, oligonukleotidra, nukleinsavra, oligoszacharidra, fehérjére vagy monoklonális antitestre nézve agonista vagy antagonistá anyag.

#### 4. Monomer

Egymással összekapcsolódva polimer képzésére alkalmas kis molekulákból álló sorozat egyik tagja. A monomerkészlet lehet például a szokásos L-aminosavakból, D-aminosavakból, szintetikus aminosavakból és nukleotidokból álló készlet. Az értelmezés szerint a monomer a polimer előállítására alkalmazott alapkészlet bármely tagja, így például az L-aminosavak dimerjei 400 monomerekből álló alapkészletet képeznek a polipeptid előállításához. A polimerszintézis egymást követő lépéseiben a monomerek különböző alapkészletei alkalmazhatók.

#### 5. Peptid

Amidkötéssel összekapcsolt  $\alpha$ -aminosav monomerekből álló polimer, amely polipeptidnek is nevezhető. A leírás keretein belül az aminosav lehet az L optikai izomer vagy a D optikai izomer. A peptidnek legalább két aminosav-hosszúságúak, gyakran több, mint 20 aminosavmonomert tartalmaznak. Jelölésükre az aminosavak szokásos rövidítéseit (például P a prolinra) alkalmazzuk. Ezeket a rövidítéseket Stryer: Biochemistry, 3. kiadás, 1988 ismerteti.

#### 6. Fénysugárzás

Szelektíven alkalmazható energia, amely lehet például ultrabolya sugárzás, látható fény, infravörös sugárzás, vagy ezek kombinációja. A besugárzás kifejezés a sugárzásnak adott felületen történő alkalmazását jelenti.

#### 7. Receptor

Egy olyan molekula, amely egy adott ligandummal szemben affinitást mutat. A receptor lehet természetben előforduló vagy szintetikus molekula, amely alkalmazható változatlan formában vagy más anyaggal kialakított aggregátum formájában. A receptor kovalens vagy nem kovalens kötéssel egy kötőelemhez kapcsol-

lódhat közvetlenül vagy speciális kötőanyagon keresztül. A találmány értelmében receptorként alkalmazható például antitest, sejtmembránreceptor, adott antigéndeterminánsra (így vírusra, sejtre vagy más anyagra) specifikus monoklonális antitest vagy antiszérum, gyógyszerhatóanyag, polinukleotid, nukleinsav, peptid, kofaktor, lektin, cukor, poliszacharid, sejt, sejtmembrán és sejt szervecske. A receptort gyakran antiligandumnak nevezzük. A receptor kifejezés alkalmazásában jelentésbeli különbség nincs. Egy úgynevezett ligandum/receptor pár akkor alakul ki, ha két makromolekula molekuláris felismerés alapján összekapcsolódik és komplexet képez.

A találmány értelmében receptorként alkalmazható anyagokra további példaként említhető:

a) *Mikroorganizmusreceptorok*

Az olyan ligandumok azonosítása, amelyek valamely mikroorganizmus számára életfontosságú receptorhoz, így speciális transzportfehérjéhez vagy enzimhez kötődnek, felhasználható új típusú antibiotikumok kidolgozásához. Különösen fontosak a jelenlegi antibiotikumokkal szemben rezisztens, és alkalmazkodóképes gombák, protozoák és baktériumok elleni antibiotikumok.

b) *Enzimek*

Enzimek, így neurotranszmittereket hasító enzimek kötési helyének meghatározása, a különböző neurotranszmittereket hasító enzimek hatását befolyásoló receptorokhoz kötődő ligandumok azonosítása felhasználható az idegműködés betegségeinek kezelésére alkalmas gyógyszerhatóanyagok kidolgozására.

c) *Antitestek*

A találmány szerinti megoldás felhasználható például a kívánt antigén epitópjával egyesülő antitest-molekula ligandumkötő helyének meghatározására, majd az antigén epitópot utánzó szekvencia meghatározása felhasználható olyan vakcina kidolgozására, amelyben az immunogén anyag egy vagy több ilyen szekvencián alapul, valamint a megfelelő diagnosztikai szer vagy a terápiás kezelésben, így az autoimmun betegség kezelésére (például a „saját” antitest kötési helyének blokkolására) alkalmas vegyületek kidolgozására.

d) *Nukleinsav*

Nukleinsavszekvenciák szintetizálásával megállapíthatók a DNS vagy RNS kötőszekvenciák.

e) *Katalitikus polipeptid*

Olyan polimer, előnyösen polipeptid, amely gyorsítja egy vagy több reagensnek egy vagy több terméké történő átalakításához szükséges kémiai reakciót. Az ilyen polipeptid általában olyan kötési helyet tartalmaz, amely specifikus legalább egy reagensre vagy intermedierre, és a kötési hely mellett egy olyan aktív funkció csoportot tartalmaz, amely kémiai módon módosítja a megkötött reagenst. Katalitikus polipeptideket ismertet például a 404 920 számú USA-beli szabadalmi bejelentés.

f) *Hormonreceptorok*

Példaként említhetők az inzulinreceptorok és a növekedéshormon-receptorok. A receptorhoz nagy affinitással kötődő ligandum meghatározása felhasználható például a cukorbetegség kezelésére alkalmazott napi injekció helyettesítésére alkalmas orális hatóanyag kidolgozására, valamint a humán növekedéshormon-elégtelenség esetén jelenleg csak állati tetemekből vagy rekombináns DNS-technológiával előállítható hormon helyettesítésére alkalmas hatóanyag kidolgozására. További példaként említhetők az érszűkítő hatású hormonreceptorok, ahol a receptorhoz kötődő ligandumok meghatározása lehetővé teszi a vérnyomást szabályozó hatóanyagok kidolgozását.

g) *Ópiumkészítmény-receptorok*

Az agy ópiumreceptoraihoz kötődő ligandumok meghatározása felhasználható a morfium és hasonló hatóanyagok helyettesítésére alkalmas, kevésbé megszokható hatóanyagok kidolgozását.

8. *Hordozó*

Szilárd vagy félszilárd felülettel rendelkező anyag. A hordozó általában legalább egy, lényegében sima felülettel rendelkezik, bár sok esetben előnyös lehet, ha a különböző polimerek szintézisének területét fizikailag szétválasztjuk, például üregek, kiemelkedő szakaszok, bemetszett árkok és hasonlók segítségével. Más esetben a felületen kisméretű gyöngyöket alakítunk ki, amelyek a szintézis befejezése után felszabadíthatók.

9. *Védőcsoport*

Valamely monomer egységhez kapcsolódó olyan anyag, amely aktivátorral, így fénysugárással végzett szelektív kezeléssel hasítással eltávolítható. Védőcsoportként alkalmazható például nitro-veratril-oxi-karboxil-csoport, nitro-benzil-oxi-karbonil-csoport, dimezil-dimetoxi-benzil-oxi-karbonil-csoport, 5-bróm-7-nitro-indolinil-csoport, O-hidroxi- $\alpha$ -metil-cinnamoil-csoport és 2-oxi-metilén-antrakinon. Aktivátorként alkalmazható továbbá például ionnyaláb, elektromos mező, mágneses mező, elektronnyaláb és röntgensugárzás.

10. *Előre meghatározott részfelület*

Valamely felület előre meghatározott részfelülete olyan lokalizált terület, amely a polimer kialakítása érdekében aktiválható. Az előre meghatározott részfelület alakja tetszőleges, lehet például kör alakú, négyzetes, elliptikus, ék alakú vagy hasonló. Az egyszerűség kedvéért az előre meghatározott részfelületet gyakran röviden részfelületnek nevezzük.

11. *Lényegében tiszta*

Valamely polimer egy hordozó előre meghatározott részfelületén belül lényegében tisztának minősül akkor, ha olyan jellemzőkkel rendelkezik, amelyek megkülönböztetik a többi, előre meghatározott részfelülettől. Általában a tisztaságot mérjük a biológiai aktivitás, vagy valamely más, az egységes szekvenciából származó funkció alapján. A jellemzők mérésére előnyösen alkalmazható valamely ligandumhoz vagy receptorhoz történő kötődés vizsgálata.

Mint fent említettük, a találmány tárgya eljárás és készülék nagyszámú polimer szekvenciának valamely hordozó előre meghatározott részfelületein történő előállítására. A találmány szerinti megoldást részletesen aminosavszekvenciákat tartalmazó molekulák előállítása vonatkozásában ismertetjük, de ugyanígy felhasználható más polimerek előállítására is. A találmány szerinti megoldással előállítható polimerekre példaként említhetők a nukleotidok lineáris vagy ciklikus polimerjei (oligonukleotidok),  $\alpha$ -,  $\beta$ - vagy  $\Omega$ -aminosavakból álló peptidok és olyan heteropolimerek, amelyekben egy ismert gyógyszerhatóanyag kovalens kötéssel valamely fenti polimerhez kötődik, valamint minden más olyan polimer, amelynek előállíthatósága a leírás alapján nyilvánvaló. A találmány szerinti megoldást előnyösen peptidok szintézisére alkalmazzuk.

Az előállított hordozót felhasználhatjuk például különböző polimerek vizsgálatához, amikor is a polimert ligandumként valamely receptorhoz kötjük, nyilvánvaló azonban, hogy a találmány szerinti megoldás felhasználható a ligandum megkötésére szolgáló receptor előállítására is. A hordozó emellett egy sor egyéb célra is felhasználható. A felhasználási területekre példaként említjük a peptidszekvenciák meghatározását, a fehérjéhez kötődő nukleotidszekvenciák meghatározását, szekvenciától függően megkötődő gyógyszerhatóanyagok felfedezését, antitestek felismerésére alkalmas epitópok azonosítását, és klinikai és diagnosztikai célra alkalmazható gyógyszerhatóanyagok kidolgozását, valamint ezek kombinációját.

A találmány értelmében előnyösen felülettel rendelkező „S” hordozót alkalmazunk. A hordozó felületéhez adott esetben „L” kapcsolómolekulák kapcsolódnak. Az adott esetben alkalmazott kapcsolómolekulák feladata, hogy meggyorsítsák a szintetizált polimer receptor felismerőképességét.

A kapcsolómolekulát kívánt esetben a tárolás idejére kémiai védjük. Ilyen kémiai védőcsoportként alkalmazható például a terc-butoxi-karbonil-csoport (t-BOC). A kémiai védőcsoportot például savas oldattal eltávolíthatjuk. A kémiai védőcsoport feladata, hogy a felszínt a tárolás ideje alatt megvédje, majd a polimer-előállítás előtt felszabadítsa.

A hordozón vagy a kapcsolómolekulának a hordozótól távolabb eső végén egy  $P_0$  védőcsoporttal ellátott funkció csoport található. A  $P_0$  védőcsoport eltávolítható például sugárzás, elektromos mező, elektromos áram vagy más aktivátor segítségével.

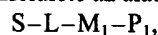
Előnyösen ultrabolya sugárzást (UV), infravörös sugárzást (IR) vagy látható fényt alkalmazunk. Mint később részletesen ismertetjük, a védőcsoport lehet továbbá valamely elektrokémiai érzékeny csoport, amely elektromos mező jelenlétében eltávolítható. Alternatív lehetőségként a védőcsoport eltávolítható ionnyaláb vagy elektronnyaláb alkalmazásával is.

A legtöbb esetben a kezelt részfelület, és ennek következtében az a terület, amelyen az egyes polimer szekvenciákat szintetizáljuk, kisebb, mint  $1 \text{ cm}^2$ , előnyösen kisebb, mint  $1 \text{ mm}^2$ . A kezelt terület értéke ezen belül legfeljebb mintegy  $10\,000 \mu\text{m}^2$ , elsősorban

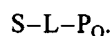
legfeljebb  $100 \mu\text{m}^2$ , bizonyos esetekben kiterjedése csak egyetlen molekula kötődését teszi lehetővé. A kezelt részfelületeken az egyes polimereket előnyösen lényegében tiszta formában szintetizáljuk.

A hordozó ismert részfelületének fényvel történő megvilágításával egy időben vagy ezt követően a részfelületet egy  $M_1$  első monomer egységgel érintkeztetjük, amely reagál a védőcsoport eltávolítása után felszabaduló funkció csoporttal. Az első monomer egy  $P_1$  védőcsoportot hordoz, amely adott esetben azonos a  $P_0$  védőcsoporttal.

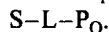
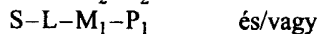
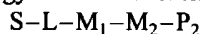
Ennek megfelelően, az első ciklus után a felület ismert első részfelülete az alábbi szekvenciát hordozza:



míg a felület fennmaradó részfelületeinek szekvenciája:

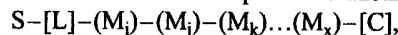


Ezután a felület második részfelületét (amely magában foglalhatja az első részfelületet is), fényvel megvilágítjuk, és  $M_2$  második monomerrel érintkeztetjük (amely azonos vagy különböző az  $M_1$  monomertől), amely  $P_2$  védőcsoportot hordoz. A  $P_2$  védőcsoport lehet azonos vagy különböző a  $P_0$  és  $P_1$  védőcsoporttól. A második ciklus után a hordozó különböző részfelületei egy vagy több alábbi szekvenciát hordoznak:



A fenti folyamatot addig ismételjük, amíg a hordozó a kívánt hosszúságú szükséges polimereket hordozza. A hordozónak a fényvel megvilágított, és a reagensekkel kezelt részfelületeinek szabályozásával az egyes szekvenciák kialakulásának helye azonosítható.

Ezután a hordozón maradó védőcsoportok nagy részét eltávolítjuk, és a szekvenciákat kívánt esetben egy C záróegységgel lezárjuk. Az eljárás során a kapott hordozó felülete nagyszámú olyan polimert tartalmaz, amely a következő általános képlettel ábrázolható:



a képletben a szögletes zárójel adott esetben előforduló csoportot jelöl,  $M_1\dots M_x$  a monomerek tetszőleges szekvenciáját jelöli. A monomerek száma széles határok között változhat, értéke előnyösen 2–100.

Egyes esetekben a hordozó különböző részfelületein található polimerek közös monomer alszekvenciát is tartalmaznak. Így például előfordulhat, hogy az első helyen  $S-M_1-M_2-M_3$  szekvenciájú polimert és a második helyen  $S-M_4-M_2-M_3$  szekvenciájú polimert szintetizálunk. A folyamat megindításához az első helyet besugározzuk, majd  $M_1-P$  monomerrel kezeljük, és így az első helyen  $S-M_1-P$  szekvenciát kapunk. A második helyet ezután besugározzuk és  $M_4-P$  monomerrel kezeljük, amelynek során a második helyen  $S-M_4-P$  szekvenciát kapunk. Ezután mind az első, mind a második helyet besugározzuk, és  $M_2-M_3$  dimerrel reagáltatjuk, amelynek során az első helyen  $S-M_1-M_2-M_3$  szekvenciát, és a második helyen  $S-M_4-M_2-M_3$  szekvenciát kapunk. Természetesen, tetszőleges hosszúságú közös alszekvenciát alkalmazha-

tunk, amely legalább 2 monomerből, előnyösen 2–100 monomerből, elsősorban 2–20 monomerből, ezen belül előnyösen 2–3 monomerből áll.

A találmány szerinti megoldás egy másik megvalósítási módja szerint az első monomerréteghez egy sor maszkot alkalmazunk, majd különböző hullámhosszúságú fényvel szelektív aktiválást végzünk. Így például a fent említett eljárásnál az első részfelületet először egy maszkon keresztül sugározzuk be, és egy  $P_1$  első védőcsoportot hordozó első monomerral reagáltatjuk. A  $P_1$  első védőcsoport egy első hullámhosszúságú fény (például IR) hatására eltávolítható. A maszkot ezután átvisszük a második részfelületre, egy  $P_2$  második védőcsoportot hordozó második monomerral reagáltatjuk, ahol a védőcsoport egy második hullámhosszúságú fényvel (például UV) távolítható el. Ezután a maszk feleslegessé válik, mert a hordozó a védőcsoport-eltávolítási ciklusban teljes egészében váltakozva besugározható az első vagy a második hullámhosszúságú fényvel.

A hordozón a fenti eljárások valamelyikével előállított polimer különböző célokra, például a biológiai aktivitás vizsgálatára felhasználható. Az ilyen hatásvizsgálatoknál a szekvenciát tartalmazó hordozón jelöletlen vagy jelölt recepttorral, így antitesttel, sejtreceptorral, foszfolipid hólyagocskával, vagy bármely más recepttorral kezeljük. Előnyösen úgy járunk el, hogy a polimert egy első, jelöletlen recepttorral reagáltatjuk, majd egy jelölt, receptorspecifikus felismerő elemmel, például antitesttel kezeljük. Ezzel az eljárással a detektálási lépésben megfelelő jelet kapunk.

A receptormolekula egy vagy több, hordozón lévő polimerhez kötődhet. A jelölt receptor jelenléte, és ezáltal a recepttorral kötődő szekvencia jelenléte előnyösen detektálható a fluoreszcens fény kimutatására alkalmas autoradiográfias módszerrel. Detektorként alkalmazható például töltésérzékeny eszköz vagy fluoreszcens mikroszkóp. A receptor kötési helyén található polimer szekvenciája felhasználható a recepttorral komplementer szekvencia részének vagy egészének meghatározásához.

A találmány szerinti megoldás alkalmazását a leírásban a biológiai aktivitás vizsgálatával összefüggésben ismertetjük. A találmány felhasználható azonban egyéb célokra is, például információ tárolására (így optikai lemezen), molekuláris elektronikai eszközök előállítására, az elválasztási technológiában alkalmazható állófázis előállítására, festékek és tisztítószerke előállítására, fotográfias célokra, valamint sejtek, fehérjék, lektinek, nukleinsavak, poliszacharidok és hasonlók esetében egy adott polimer szekvencia molekuláris felismerése szerinti minta alapján történő immobilizálására. Ugyanazon vegyületnek szomszédos helyzetben, progresszív módon változó koncentrációban történő előállításával olyan gradienst hozhatunk létre, amely felhasználható a kemotaxis szabályozására, vagy diagnosztikai mérőeszköz kifejlesztésére, például valamely antitestnek az antigén növekvő mennyiségével szemben történő titrálására. Egy sor katalizátormolekulának szoros közelségben történő előállításával az úgynevezett „koordinatív im-

mobilizálás” útján fokozni lehet a többlépéses konverziók hatékonyságát. A koordinatív immobilizálás felhasználható továbbá az elektronátviteli rendszerekben, valamint szerkezeti integritás vagy más kívánatos tulajdonságok, így kenőhatás vagy nedvesíthetőség kialakítására.

A megoldás alkalmazható továbbá molekulák bieloszlásának vagy farmakokinetikus tulajdonságainak vizsgálatára is.

Így például intesztinális vagy szérum proteázokkal szembeni rezisztencia kialakításához a polimert egy fluoreszcens címkével lezárjuk, és a vizsgált biológiai folyadékkal kezeljük.

Az 1. ábra a találmány szerinti megoldás ismertetett megvalósítási módját mutatja, és a 2 hordozót keresztmetszetben ábrázolja. A találmány értelmében lényegében bármely megfelelő hordozó alkalmazható. A hordozó lehet biológiai, nem biológiai, szerves vagy szervetlen anyag vagy ezek kombinációja. Megjelenési formáját tekintve lehet szemcse, szál, csapadék, gél, lap, cső, golyó, üreges test, kapilláris, párna, szelet, film, tányér, lemez és hasonlók. A hordozó alakja szintén tetszőleges, lehet kerek vagy négyzetes lemez, gömb vagy kör alakú. A hordozó előnyösen lapos, de bármely más felületi konfigurációt felvehet. Így például a hordozó tartalmazhat kiemelkedő vagy besüllyedő szakaszokat, amelyekben a szintézis megvalósítható. A hordozó és felülete előnyösen egy merev támasztékot képez, amelyen az említett reakciók lejátszódnak. A hordozóval és felületével szemben további követelmény, hogy megfelelő fényelnyelő jellemzőkkel rendelkezzen. Hordozóként alkalmazható tehát például polimerizált Langmuir Blodgett film, funkció csoportokkal ellátott üveg, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO<sub>2</sub>, SiN<sub>4</sub>, módosított szilikon vagy bármely más gél vagy polimer, így (poli)tetrafluor-etilén, (poli)vinilidén-difluorid, polisztirol, polikarbonát vagy ezek keverékei. A területen jártas szakember a leírásban adott kitanítás alapján további anyagokat is találhat. Hordozóként különösen előnyösen alkalmazható a sima üveg vagy egykristály szilikon, amelynek felületi domborzata legfeljebb 10 Å méretű.

Egyes esetekben a hordozó felületét önmagában ismert módon maratva alakítjuk ki a kívánt felszíni képződményeket. Így például árkok, V alakú barázdák és lapos tetejű kiszögelések képzésével a szintézis részfelületeit összegyűjtjük a visszaverődő fény fókuszpontjában, és így reflexiós „tükrö”-szerkezetet képzünk, ami elősegíti a fény összegyűjtését a fluoreszkáló fényforrásból.

A szilárd hordozó felszínét általában, de nem mindig, magának a hordozónak az anyagából alakítjuk ki. Így a felszín egy sor különböző anyagból kiképezhető, példaként említhetők a polimerek, műanyagok, gyanták, poliszacharidok, szilícium-dioxid és ezen alapuló anyagok, szén, fém, szervetlen üveg, membrán vagy bármely fent felsorolt hordozó alapanyag. Egyes esetekben a felületre rácsos kötőelemeket illesztünk, amelyek lazán kapcsolódnak a hordozó felületéhez (404 920 számú USA-beli szabadalmi bejelentés). A felület előnyösen reakcióképes csoportokat tartalmaz, ezekre példa-

ként említhető a karboxilcsoport, aminocsoport és hidroxilcsoport. Előnyösen optikailag átlátszó felületet alkalmazunk, amely Si-OH funkciók csoportokkal rendelkezik a szilícium-dioxid-felületekhez hasonlóan.

A hordozó 4 felületét előnyösen 6 kapcsolómolekula-réteggel látjuk el, bár hangsúlyozzuk, hogy a kapcsolómolekula nem kötelező eleme a találmány szerinti megoldásnak. A kapcsolómolekula előnyösen elegendő hosszúságú ahhoz, hogy a polimerrel ellátott hordozó polimer része szabadon reagáljon a hordozó kezelésére alkalmazott molekulákkal. Ebben az értelemben előnyösen alkalmazhatók a 6–50 atom hosszúságú kapcsolómolekulák. Kapcsolómolekulaként alkalmazható például aril-acetilén, 2–10 monomer egységet tartalmazó etilén-glikol-oligomer, diamin, disav, aminosav vagy ezek elegye. A leírásban szereplő kitanítás alapján más kapcsolómolekulák is alkalmazhatók.

Eljárhatunk úgy is, hogy a kapcsolómolekulát a hidrofíli/hidrofób tulajdonságok alapján választjuk ki, és így javítjuk az előállított polimernek bizonyos receptorokkal szembeni megkötőképességét. Így például, hidrofíli receptor esetében a hidrofíli kapcsolómolekula elősegíti, hogy a receptor jobban megközelítse a szintetizált polimert.

Eljárhatunk úgy is, hogy a kapcsolómolekulát a molekula közepén fotokémiailag lehasítható csoporttal látjuk el. A fotokémiailag lehasítható csoport előnyösen a védőcsoport eltávolítására alkalmazott fény hullámhosszától eltérő hullámhosszúságú fénnyel hasítható le. Ez lehetővé teszi, hogy a szintézis befejezése után a kapott polimert az adott hullámhosszúságú fénnyel történő megvilágítás után könnyen eltávolítsuk.

A kapcsolómolekula a hordozóhoz kapcsolódhat szén-szén kötéssel, például (poli)trifluor-klór-etilén-felület esetében vagy előnyösen sziloxánkötéssel, például üveg vagy szilikon-oxid-felület esetén. A hordozó felületén kialakított sziloxánkötés kialakítható például úgy, hogy a felületet triklór-szilil-csoportot hordozó kapcsolómolekulával reagáltatjuk. A kapcsolómolekulát adott esetben adott rendszer szerint kapcsoljuk a felülethez, mint például a polimerizált Langmuir-Blodgett film részét képező fejcsoportokat. Eljárhatunk úgy is, hogy a kapcsolómolekulát a hordozó felületén adszorbeáljuk.

Az alkalmazott kapcsolómolekulák és monomerek védőcsoporttal ellátott funkciók csoportot hordoznak. A védőcsoport előnyösen a kapcsolómolekulának a hordozóval ellentétes disztális vagy terminális végén helyezkedik el. A védőcsoport lehet valamely negatív védőcsoport (vagyis a kapcsolómolekula a védőcsoport eltávolítása után kevésbé reakcióképes a monomerrel szemben) vagy valamely pozitív védőcsoport (vagyis a kapcsolómolekula a védőcsoport eltávolítása után erősebben reakcióképes a monomerrel szemben). Negatív védőcsoport alkalmazása esetén egy további lépésként reaktiválást kell végezni. Ez egyes esetekben melegítéssel megvalósítható. A kapcsolómolekula védőcsoportja lehet bármely pozitív, fénnyel reaktiválható csoport, előnyösen valamely nitroaromás vegyület, így o-nitro-benzil-származék vagy benzil-szulfonil-csoport. Védőcso-

portként előnyösen alkalmazható a 6-nitro-veratril-oxi-karbonil-csoport (NVOC), 2-nitro-benzil-oxi-karbonil-csoport (NBOC) vagy  $\alpha,\alpha$ -dimetil-dimetoxi-benzil-oxi-karbonil-csoport (DDZ). Előnyösen alkalmazhatók az olyan nitroaromás vegyületekből levezethető csoportok, amelyek a nitrocsoporthoz képest orto-helyzetben benziles hidrogénatomot tartalmaznak. Az ilyen csoportok az (I) általános képlettel ábrázolhatók, a képletben

$R_1$  jelentése alkoxicsoport, alkilcsoport, halogénatom, arilcsoport, alkenilcsoport vagy hidrogénatom,

$R_2$  jelentése alkoxicsoport, alkilcsoport, halogénatom, arilcsoport, nitrocsoport vagy hidrogénatom,

$R_3$  jelentése alkoxicsoport, alkilcsoport, halogénatom, nitrocsoport, arilcsoport vagy hidrogénatom,

$R_4$  jelentése alkoxicsoport, alkilcsoport, hidrogénatom, arilcsoport, halogénatom vagy nitrocsoport,

$R_5$  jelentése alkilcsoport, alkinilcsoport, cianocsoport, alkoxicsoport, hidrogénatom, halogénatom, arilcsoport vagy alkenilcsoport.

További példaként említhetők az O-hidroxi- $\alpha$ -metil-cinnamoil-származékokból levezethető csoportok.

Fotokémiailag eltávolítható védőcsoportokat ismeret például Patchornik: *J. Am. Chem. Soc.* 92, 6333 (1970); Amit és munkatársai: *J. Org. Chem.*, 39, 192 (1974).

Eljárhatunk úgy is, hogy a pozitív reakcióképes csoportot az oldatban lévő reagenssel történő reagáltatás előtt aktiváljuk. Így például, az 5-bróm-7-nitro-indolincsoport karbonilcsoporthoz kötődve 420 nm hullámhosszúságú fénnyel besugározva reakcióba vihető.

Eljárhatunk továbbá úgy is, hogy a kapcsolómolekulán reakcióképes csoportként valamely negatív, fénnyel aktiválható csoportot, így cinnamátcsoporthoz alkalmazunk.

A reakcióképes csoport emellett aktiválható vagy dezaktiválható például elektronnaláb, röntgensugárzás vagy bármely más sugárzás segítségével. Az elektronnalábbal aktiválható reakcióképes csoportokra példaként említhető a szulfonilcsoport. Az aktiválásra alkalmazható továbbá valamely áramforrás is. Az egyéb alkalmazható reakcióképes csoportok és aktiválási eljárások a leírásban megadott kitanítás alapján szakember számára nyilvánvalóak.

Mint az 1. ábrából látható, a kapcsolódó molekulát például egy 8 maszkon keresztül a félvezetőiparban ismert fotolitográfias módszerrel világítjuk meg [Sze: *VLSI Technology*, McGraw-Hill (1983); Mead és munkatársai: *Introduction to VLSI Systems*, Addison-Wesley (1980)]. A fény közvetlenül a védőcsoportot hordozó felületre vagy a hordozó hátoldalára irányítható, amennyiben a hordozó átlátszó a védőcsoport eltávolítására alkalmazott hullámhosszúságú fény vonatkozásában. Az 1. ábrán szereplő megoldás szerint a fényt a hordozónak a védőcsoportokat hordozó felületére irányítjuk. Az 1. ábra a maszk alkalmazásának technikáját mutatja be pozitív reakcióképes csoportok esetén, ami-



kor is a kapcsolódó molekulákat a 10a és 10b területeken aktiváljuk, és a funkciócsoportokat reagáltatjuk.

A 8 maszk lehet például valamely átlátszó hordozóanyag, amely a megfelelő területeken szelektíven átlátszatlan anyag rétegével van bevonva. Az átlátszatlan anyag részfelületeit eltávolítjuk, és az átlátszatlan anyagot a hordozó felületén megkívánt pontos mintának megfelelően hagyjuk meg. A maszkot a hordozó felületének közelében helyezük el, vagy az 1. ábrán látható módon közvetlenül a hordozó felületével érintkeztetjük. A maszk „nyílásai” a hordozó azon részfelületeinek felelnek meg, ahol a hordozó fotokémiailag eltávolítható védőcsoportjait le kívánjuk hasítani. A kijelölést bármely szokásos módon végezhetjük, amelynek során például kítűzőjeleket (az ábrán nem szerepel) alkalmazunk abból a célból, hogy a maszkot pontosan a kívánt minta szerint helyezzük el. További módszerként alkalmazhatók az interferometriás technikák is [például Flanders és munkatársai: *App. Phys. Lett.* 31, 426–428 (1977)].

A hordozón alkalmazott fénykontrasztjának javítása érdekében előnyösen kontrasztjavító anyagot helyezünk el a maszk és a hordozó között. Ez a kontrasztjavító réteg olyan molekulát tartalmaz, amely fény hatására bomlik, ilyen például a kinon-tiazid, vagy olyan anyagból áll, amely a kívánt hullámhossz vonatkozásában átlátszóan színtelen. Az átlátszóan színtelen anyagon a fény jobban áthatol, ezért a kontraszt javul. A kontraszt javítható továbbá bevont optikai szálköteg alkalmazásával is.

Fényforrásként alkalmazható például szokásos izzófényforrás, lézer vagy lézerdióda. Amennyiben nem kollimált fényt sugárzó fényforrást alkalmazunk, a fénynek a hordozón történő szétszóródásának elkerülése érdekében egy vastag vagy többrétegű maszkot alkalmazunk. Bizonyos esetekben előnyös lehet olyan csoport alkalmazása, amely különböző hullámhosszúságú fényre érzékeny, és így könnyen szabályozhatjuk a szintézist. Így például különböző hullámhosszúságokra érzékeny csoport alkalmazása lehetővé teszi a polimer szintézise során az elágazás helyének pontos meghatározását, vagy egyes maszkírozó lépések elhagyását. A reakcióképes csoportok néhány példáját és az eltávolításukra alkalmazható hullámhosszúságokat az 1. táblázatban adjuk meg.

1. táblázat

Védőcsoport	Eltávolításra alkalmas fény hullámhossza (nm)
Nitro-veratril-oxi-karbonil-csoport (NVOC)	UV (300–400 nm)
Nitro-benzil-oxi-karbonil-csoport (NBOC)	UV (300–350 nm)
Dimetil-dimetoxi-benzil-oxi-karbonil-csoport	UV (280–300 nm)
5-Bróm-7-nitro-indolinil-csoport	UV (420 nm)
o-Hidroxi- $\alpha$ -metil-cinnamoil-csoport	UV (300–350 nm)
2-Oxi-metilén-antrakinon	UV (350 nm)

A találmány szerinti megoldást elsődlegesen úgy ismertettük, hogy a hordozó egyes részfelületeinek besugárzásához maszkot alkalmazunk, ennek ellenére más technikák is felhasználhatók. Így például a hordozó elhelyezhető valamely modulált lézer vagy dióda fényforrás alatt is (4 719 615 számú USA-beli szabadalmi leírás). További példaként említhető a lézer galvanometriás scanner alkalmazása. Eljárhatunk továbbá úgy is, hogy a szintézist valamely szokásos folyadékkristályon (amely „fényszelepként” működik), vagy optikai szálakból álló fényforráson vagy azzal érintkeztetve véghezvük. A folyadékkristályok megfelelő modulálásával a fényt szelektíven szabályozni tudjuk úgy, hogy az csak a hordozó kijelölt részfelületeivel érintkezzen. Alternatív módon, a szintézis megvalósítható például valamely optikai szálköteg végén, amellyel a fényt szelektíven irányítani tudjuk. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a fénybesugárzás helyének szabályozására más megoldások is alkalmazhatók.

A hordozó besugárzását végezhetjük oldat jelenlétében (az ábrán nem szerepel) vagy annak távollétében, bár előnyösen oldat jelenlétében dolgozunk. Az oldat olyan reagenseket tartalmaz, amelyek megakadályozzák, hogy a besugárzás közben képződő melléktermékek részt vegyenek a polimer szintézisében. Az ilyen melléktermék lehet például szén-dioxid, nitrozo-karbonil-vegyület, sztirolszármazék, indolszármazék, és ezek fotokémiai reakcióval képződő származékai. Emellett, az oldat tartalmazhat olyan reagenseket is, amelyek összehangolják a hordozó refrakciós indexét. Az oldatban alkalmazható reagensekre további példaként említhetők a savas vagy bázikus pufferek, tiolok, szubsztituált hidrazinok és hidroxil-aminok, redukálószer (például NADH), valamint olyan reagensek, amelyek egy adott funkciócsoporttal reakcióba lépnek (például aril-nitrozó-vegyület + glioxilsav = aril-formhidroxamát + szén-dioxid).

A besugárzási lépéssel egy időben vagy azt követően a kapcsolómolekulákat mossuk vagy más módon egy első monomerrel érintkeztetjük (lásd 2. ábra, 12a és 12b részfelületén A). Az első monomer reakcióba lép a fényel kezelt kapcsolómolekulák aktivált funkciócsoportjával. Az első monomer, amely előnyösen valamely aminosav, egy fotokémiailag eltávolítható védőcsoportot hordoz. A monomeren lévő védőcsoport lehet azonos a kapcsolómolekulán alkalmazott védőcsoporttal, vagy attól eltérő, előnyösen a fent említett védőcsoportok valamely tagja. Eljárhatunk úgy is, hogy az A monomer védőcsoportjaként NBOC- vagy NVOC-csoportot alkalmazunk.

Mint a 3. ábrából látható, ezután a maszkot áthelyezzük úgy, hogy az ezt követő ismételt besugárzásnál a 14a és 14b részfelületeken elhelyezkedő kapcsolómolekulák védőcsoportját távolítjuk el és funkciócsoportját aktiváljuk, ahol az említett részfelületek azonosak az előzetes maszkírozó lépésben védett részfelületekkel. Eljárhatunk úgy is, hogy az első maszk áthelyezése helyett egy második maszkot alkalmazunk. Eljárhatunk továbbá úgy is, hogy az egymást követő lépésekben több lépésen keresztül ugyanazt a részfelületet

sugározzuk be. Mint a 3. ábrából látható, bizonyos esetekben előnyös, ha a besugárzott részfelületeket egymástól elválasztjuk. A megfelelő kijelölési tűréshatárhoz mintegy 1–5 µm-es elválasztás elegendő.

Mint a 4. ábrából látható, a hordozót ezután egy B második védett monomerrel kezeljük (lásd 16a és 16b részfelületeken B). A hordozót ezután ismét maszkírozunk, majd a 12a részfelületen A-n és a 16b részfelületen B-n eltávolítjuk a védőcsoportot és aktiváljuk a reakcióképes csoportot. A hordozót ezután ismét B monomerrel kezeljük, amelynek során a 6. ábrán mutatott szerkezetet kapjuk. A hordozón a B–A és B–B dimereket állítjuk elő.

A maszkírozási és az A monomerrel végzett reagáltatási lépések újabb sorozatával a 7. ábrán mutatott szerkezetet kapjuk, ami a B és A monomerekből lehetséges valamennyi dimert, vagyis a B–A, A–B, A–A és B–B dimereket eredményezi.

A hordozó, a szintézis területe, valamint az egyes polimerek előállítására alkalmazott terület mérete és alakja tetszőleges. Lehet például négyszögletes, ellipszis alakú, téglalap, háromszög, kör vagy ennek részei, valamint bármely szabálytalan geometriai forma. Megfelelő mennyiségű polimer előállítása érdekében egy adott hordozó több részfelületén azonos szintézist végzünk.

A hordozón található 12 és 16 szakaszok felülete általában  $1-10^{-2}$  cm<sup>2</sup>, ezen belül előnyösen legfeljebb  $10^{-1}$  cm<sup>2</sup> vagy  $10^{-2}$  cm<sup>2</sup>. A 12 és 16 részfelületek mérete előnyösen mintegy  $10 \times 10$  µm és  $500 \times 500$  µm között van.

A találmány megvalósítása során eljárhatunk úgy, hogy egyetlen hordozón több, mint 10 különböző monomer szekvenciát, előnyösen több mint 100 különböző monomer szekvenciát állítunk elő, bár az egyetlen hordozón előállított különböző szekvenciák száma meghaladhatja a  $10^3$  értéket. Természetesen, a hordozó valamely monomer szekvencia előállítására alkalmazott részfelületén előnyösen lényegében tiszta monomer szekvenciát szintetizálunk. Eljárhatunk azonban úgy is, hogy a hordozó egyes részfelületein szintetizált polimer szekvencia tisztasága legalább 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% vagy 99%.

Eljárhatunk továbbá úgy is, hogy egy adott részfelületen belül szándékosan több szekvenciát állítunk elő, majd a biológiai aktivitás gyors vizsgálata után az adott részfelületeken a szignifikáns kötődést mutató anyagokat szintetizáljuk tovább.

A 8A. ábra egy polimer hordozón történő előállítására alkalmas 100 reaktorrendszer egyik előnyös kialakítási formáját mutatja vázlatosan. A reaktorrendszer egy 102 reaktortestből és annak felületén kialakított 104 reaktortérből áll. A 104 reaktortér mélysége mintegy 50–1000 µm, előnyösen mintegy 500 µm.

A reaktortér alján előnyösen adott rendszerben elhelyezett 106 kiszögellések vannak kialakítva, amelyek az ábra síkjában és az ábra síkjával párhuzamosan helyezkednek el. A kiszögellések mélysége előnyösen mintegy 50–200 µm, távolságuk mintegy 2-3 mm. A kiszö-

gelések feladata, hogy a jobb elkeveredés érdekében turbulens áramlást hozzanak létre. A reaktortér aljának felülete előnyösen fényelnyelő anyagból van kialakítva, és így megakadályozza a ráeső fény visszaverődését.

A 112 hordozó a 104 reaktortér felett van elhelyezve. A hordozó 114 alsó felületén fotokémiailag eltávolítható védőcsoporttal, így NVOC védőcsoporttal van ellátva, amely adott esetben kapcsolómolekulán keresztül kapcsolódik. A hordozó előnyösen széles spektrumú fény vonatkozásában átlátszó, de alkalmazható olyan hordozó is, amely csak az eltávolítandó védőcsoportnak megfelelő hullámhosszúságú fény vonatkozásában átlátszó (például NVOC esetében UV fény). Hordozóként alkalmazható például közönséges mikroszkóp-üveglemez, vagy fedőlemez. A hordozó előnyösen olyan vékony, amilyen vékony csak lehet, de emellett megfelelő fizikai alátámasztást kell biztosítania. A hordozó vastagsága általában legfeljebb 1 mm, előnyösen legfeljebb 0,5 mm, különösen előnyösen legfeljebb 0,1 mm, ezen belül legfeljebb 0,05 mm. Hordozóként alkalmazható továbbá kvarc vagy szilícium-dioxid is.

A hordozó és a reaktortest további feladata, hogy egy 108 beömlőnyílás és egy 110 kiömlőnyílás kivételével lezárja a reaktorteret. A megfelelő zárás érdekében a reaktortest és a hordozó ellátható egy vagy több tömítéssel. Ez előnyösen megvalósítható úgy, hogy a reaktortest két koncentrikus tömítéssel van ellátva, és a közrefogott teret vákuum alatt tartjuk, így biztosítva a hordozó megfelelő felfekvését.

A reaktortérbe a beömlőnyíláson keresztül folyadékot vezetünk be egy 116 szivattyú segítségével, amely lehet például egy B-120–S modell (Eldex Laboratories, USA). A kiválasztott folyadékot a szivattyú segítségével átáramoltatjuk a reaktortéren, majd elvezetjük a kiömlőnyíláson keresztül, és ezután visszavezetjük vagy elvezetjük. A reaktor kívánt esetben ultrahangos besugárzással kezelhető, és/vagy melegíthető az elkeveredés elősegítése érdekében.

A 112 hordozó felett egy 120 lencse van elhelyezve, amely lehet például egy 50,8 mm-es 100 mm fókuszávolságú fuzionált szilícium-dioxid-lencse. Kompakt rendszer kialakítása érdekében a hordozóra egy 122 fényvisszaverő tükör irányítja a 124 fényforrásból származó fényt. A 124 fényforrás lehet például xenon (Hg) fényforrás (Oriel, 66024 cikkszám). A maszk képét egy 126 második lencse vetíti rá a 112 hordozóra. A litográfiának ezt a formáját vetítéses másolásnak nevezzük. Nyilvánvaló, hogy megfelelő elrendezésben a megközelítéses átmásolás és bármely más módszer is alkalmazható.

A fényforrásból származó fény a 128 maszk hatására csak egyes helyeken éri el a hordozót. A 128 maszk lehet például maratással krómozott üveglemez. A 128 maszk kívánt esetben átlátszó helyekből és átlátszatlan helyekből álló rácsozattal látható el. Maszkként előnyösen alkalmazhatók a Photo Sciences Inc. (USA) termékei. A fény szabadon áthatol a maszk átlátszó szakaszain, de visszaverődik vagy elnyelődik a többi szakaszokon. Ennek következtében a fény csak a hordozó kiválasztott részfelületeit éri el.

Mint fent említettük, a hordozó részfelületeinek szelektív besugárzására a szokásos maszkok mellett fényselepek (folyadék-kristályok) is alkalmazhatók. Emellett, optikai szálakból kialakított sík tárcsa (például Schott Glass Inc., USA) is alkalmazható a maszk kontrasztjának fokozására, vagy a fény meghatározott részfelületre történő irányítására. Az ilyen sík tárcsát közvetlenül a 8A. ábrán ábrázolt reaktorban elhelyezett hordozó felett vagy magán a hordozón helyezük el. A kontraszt javítására további elemként alkalmazhatók rovarszemlencsék, valamint bevont optikai szálakból kialakított sík tárcsák is.

A fény hullámhosszúánál kisebb részfelületek besugárzására ennél fejlettebb technikát kell alkalmazni. Ennek során például a fényt például mikropipetta csúcsán elhelyezett molekuláris mikrokristályok segítségével irányítjuk a hordozóra. Ilyen eszközöket ismertet Lieberman és munkatársai: *Science*, 247, 59–61 (1990).

Működés közben a hordozó a reaktortéren helyezkedik el és lezárja azt. A hordozó előállításának valamennyi lépését helyi megvilágítással, elsődlegesen vagy kizárólag a védőcsoport eltávolításához alkalmazott tartományon kívül eső hullámhosszúságú fényvel végezzük. Így például, NVOC esetében a helyi megvilágításhoz szokásos sötétkamra-megvilágítást alkalmazunk, amely csak legfeljebb kevés UV fényt tartalmaz. Az egyes műveleteket előnyösen szobahőmérsékleten hajtjuk végre.

Az első, védőcsoport-eltávolító folyadékot (monomer nélkül) átáramoltatjuk a reaktortéren. Oldatként előnyösen kénsav dioxánban felvett 5 mmol/l koncentrációjú oldatát alkalmazzuk, ami protonálja az aktivált aminocsoportokat, és csökkenti a fotolízis melléktermékével szembeni reakcióképességüket. A védőcsoport-eltávolító folyadékban fényelnyelő anyagok, így N,N-dietil-amino-2,4-dinitro-benzol alkalmazható a fény elnyelése, a visszaverődés megakadályozása és a nemkívánatos fotolízis elkerülése érdekében.

A lemezt ezután a maszkon keresztülhaladó fénysugár útjába helyezzük azért, hogy a hordozón besugározzuk az első részfelületeket, és így eltávolítsuk a védőcsoportokat. A hordozót általában mintegy 1–15 percen keresztül, előnyösen 10 percen keresztül 10–20 mW/cm<sup>2</sup> intenzitású, és 365 nm hullámhosszúságú fényvel világítjuk meg. A lemezeket a fotolízis után például metilén-kloridban felvett diizopropil-etilamin (DIEA)-oldattal mintegy 5 percen keresztül semlegesítjük (vagyis pH=7 értékre állítjuk).

Az első monomert ezután a hordozó első részfelületeihez kötjük. Besugárzás után a lemezt eltávolítjuk, az egészet kezeljük, majd ismét az áramlási cellába helyezzük. Eljárhatunk úgy is, hogy az, előnyösen védőcsoporttal védett, első monomert tartalmazó folyadékot áramoltatunk át a reaktortéren a 116 szivattyú segítségével. Ha a hordozó első részfelületein egy Y aminosavat kívánunk megkötni, akkor ( $\alpha$ -nitrogén-atomján védőcsoportot hordozó) Y aminosavat a monomer aktiválásához szükséges reagensekkel és/vagy hordozóanyagokkal együtt egy 118 tárolóedényből a szivattyún keresztül átáramoltatjuk a reaktortéren, majd a kiömlőnyíláson keresztül visszavezetjük a szivattyúhoz.

A monomert hordozó oldat előállításához előnyösen egy első oldatot (továbbiakban A oldat) és egy második oldatot (továbbiakban B oldat) keverünk. A 2. táblázatban egy A oldatként alkalmazható elegy összetételét adjuk meg.

### 2. táblázat

A monomer hordozóoldat összetétele

10 100 mg NVOC aminocsoporttal védett aminosav  
37 mg HOBT (1-hidroxi-benzotriazol)  
250  $\mu$ l DMF (dimetil-formamid)  
86  $\mu$ l DIEA (diizopropil-etil-amin)

15 Egy B oldat példaszzerű összetételét a 3. táblázat mutatja. Az A és B oldatokat összekeverjük, és szobahőmérsékleten mintegy 8 percen keresztül reagáltatjuk, majd 2 ml DMF-fel hígítjuk, és 500  $\mu$ l-es részletekben a lemez felületére adagoljuk, vagy az oldatot a reaktorrendszeren keresztüláramoltatjuk, és szobahőmérsékleten mintegy 2 órán keresztül reagáltatjuk. A lemezt ezután DMF-vel, metilén-kloriddal és etanollal mossuk.

### 3. táblázat

B monomer hordozóoldat összetétele

25 250  $\mu$ l DMF  
111 mg BOP (benzo-triazolil-n-oxi-trisz(dimetil-amino)-foszfónium-hexafluor-foszfát)

30 Miközben a megköttendő monomert tartalmazó oldat a reaktortéren keresztüláramlik, az aminosav vagy az egyéb monomer karboxiterminális végén a hordozó védőcsoportjától megfosztott aminocsoportjaival reagál. Bár a találmány szerinti megoldást úgy mutatjuk be, hogy a monomer a reaktortéren keresztüláramlik, a találmány megvalósítható úgy is, hogy a lemezt eltávolítjuk a reaktorból, és egy megfelelő monomeroldatba merítjük.

40 Az első monomer hozzáadása után az első aminosavat tartalmazó oldatot kiöblítjük a rendszerből. Megfelelő mennyiségű DMF/metilén-klorid átáramoltatása általában elegendő az aminosav eltávolítására (a szükséges mennyiség mintegy a reaktortér és a kapcsolódó vezeték térfogatának 50-szerese), a maszkot vagy a hordozót visszahelyezzük, vagy egy új maszkot helyezünk el úgy, hogy a hordozó második részfelületeit világítsuk meg, és a 124 fényforrással elvégezzük a második megvilágítást. Ez a hordozó második részfelületein távolítja el a védőcsoportokat, és ezt a folyamatot a kívánt polimer szekvencia előállításáig ismételtük.

45 A kapott hordozószármazékot ezután a kívánt recepttorral, előnyösen jelölt recepttorral, például fluoreszcens markerrel jelölt recepttorral kezeljük úgy, hogy a recepttor oldatát vagy szuszpenzióját a reaktortéren átáramoltatjuk, vagy a lemez felületével érintkeztetjük. A recepttor a hordozónak a megfelelő komplementer szekvenciát tartalmazó adott részfelületein kötődik meg.

60 Az antitesteket általában úgynevezett „szuperkóktélban” szuszpendáljuk, amely lehet például mintegy 1 tö-

meg%-os BSA (borjúszérum-albumin), 0,5 tömeg% Tween PBS-ben (foszfáttal puffertolt sóoldatban) felvett oldata. Az antitestet a szuperkoktélpufferben például mintegy 0,1–4 µg/ml végső koncentrációra hígítjuk.

A 8B. ábra a 8A. ábra szerinti reaktorrendszer egy másik kialakítási módját ismerteti. Ennek értelmében a 128 maszkot közvetlenül érintkeztetjük a hordozóval. A maszk maratott részeit előnyösen úgy helyezzük el, hogy csökkentsék a fényszóródás hatását. Ennél az elrendezésnél nincs szükség a leképezéshez a 120 lencsére és a 126 második lencsére, mivel a maszk a hordozó közvetlen közelében van elhelyezve.

A jel/zaj viszony növelése érdekében eljárhatunk úgy, hogy a hordozót egy első jelölt vagy jelöletlen receptorral kezeljük, majd egy jelölt második receptort (például antitestet) alkalmazunk, amely az első receptor helyein kötődik. Ha például az első receptor egy első állatfajból származó antitest, akkor a második receptor egy második fajból származó, és az első faj vonatkozásában epitóp antitestszármazék. Egérantitest esetében például az antitest helyeihez fluoreszcens jelölésű antigén kecskeantitest vagy antiszérum köthető, és a fluoreszcens sugárzást az egérantitest kötődésével kapott sugárzáshoz viszonyítjuk. Ez az eljárás további antitestekkel (például kecske-egér-kecske antitesttel) megismételhető, és így újabb jelek nyerhetők.

Az eljárás megvalósítása során előnyösen úgy járunk el, hogy több maszkot alkalmazunk megfelelő sorrendben. Egy adott monomerszétből kiindulva egyetlen maszk alkalmazásával az összes lehetséges polimer előállítható.

Ha például a négy alapházisból a lehetséges összes tizenhat dinukleotidot elő akarjuk állítani, egy 1 cm élhosszúságú négyzetes szintézisszakaszt teljesen egyenlő 16 darab boxra osztunk, amelyek szélessége egyenként 0,25 cm. A négy monomeregységet A, B, C és D

betűkkel jelöljük. Az első reakciókat négy függőleges oszlopban végezzük, amelyek szélessége 0,25 cm. Az első maszkkal a bal oldali boxok oszlopát aktiváljuk, és idekapcsoljuk az A monomert. A második maszkkal a következő oszlopot aktiváljuk, ahova a B monomert kapcsoljuk. Ezt követi a harmadik maszk a C oszlopra és az utolsó maszk a jobb oldali oszlop aktiválására, ahol a D monomert kapcsoljuk. Az első, második, harmadik és negyedik maszk lehet ugyanaz a maszk, amelyet különböző irányokba eltolunk.

A folyamatot vízszintes irányban megismételjük a dimmer második egységére. Ezúttal a maszkokkal vízszintes sorokat aktiválunk ismét 0,25 cm szélességben. Az A, B, C és D monomereket egymás után kapcsoljuk, amelynek során olyan maszkokat alkalmazunk, amelyek vízszintes irányban negyedelik a reakcióteret. A kapott hordozó a lehetséges valamennyi tizenhat dinukleotidot tartalmazza.

A dinukleotid előállítására alkalmazott nyolc maszk eltolásával vagy forgatással egymásba átalakítható. A gyakorlatban egy maszk elegendő mind a nyolc lépéshez, ha azt megfelelően forgatjuk és eltoljuk. Így például egyetlen átlátszó szakaszt tartalmazó maszk felhasználható a négy függőleges oszlop aktiválására, majd ha ezután 90 fokban elforgatjuk, ugyanígy alkalmazható a vízszintes sorokra is.

A 4. és 5. táblázat egy Quick Basic nyelven írt egyszerű komputerprogramot ábrázol három monomerből (maradékából) álló polimerlánc előállításához szükséges maszkírozás és mintakivitel megtervezéséhez, ahol a polimer lánc három különböző monomert tartalmaz az első szinten, négy különböző monomert a második szinten és öt különböző monomert a harmadik szinten, ahol a szintek sávosan helyezkednek el. A program kimenetén a cellák (boxok) száma, az egyes maszkokon lévő sávok száma, és az egyes aktiválási lépésekhez szükséges maszkeltolási lépések száma jelenik meg.

#### 4. táblázat

#### Maszkirozás programja

```
DEFINT A-Z
DIM b (20), w (20), l (500)
FS - "LPT1:"
OPEN FS FOR OUTPUT AS #1

jmax - 3           'Number of residues
b (1) - 3 : b (2) - 4 : b (3) - 5       'Number of building blocks for res 1, 2, 3
g - 1 : lmax (1) - 1

FOR j - 1 TO jmax : g - g * b (j) : NEXT j

w (0) - 0 : w (1) - g / b (1)

PRINT #1, "MASK2.BAS", DATES, TIMES : PRINT #1.
PRINT #1, USING "Number of residues - ##"; jmax
FOR j - 1 TO jmax
PRINT #1, USING "      Residue ##      ## building blocks"; j ; b (j)
NEXT j
PRINT #1, "
PRINT #1, USING "Number of cells-####"; g : PRINT #1,
```

4. táblázat (folytatás)

```

FOR j = 2 TO jmax
lmax (j) = lmax (j-1) * b(j-1)
w (j) = w (j-1) / b (j)
NEXT j

FOR j #1 TO jmax
PRINT #1, USING "Mask for residue ##"; j: PRINT #1.
PRINT #1, USING "    Number of stripes - ###"; lmax (j)
PRINT #1, USING "    Width of each stripe - ###"; w (j)
FOR l = 1 TO lmax (j)
a = l + (l-1) * w (j-1)
ae = a + w (j) - 1
PRINT #1, USING "    Stripe ## begins at location ### and ends at ###"; l; a; ae
NEXT l
PRINT #1,
PRINT #1, USING "    For each of ## building blocks, translate mask by ##
cell (s)"; b (j); w (j),
PRINT #1, : PRINT #1, : PRINT #1,
NEXT j
    
```

° Copyright 1990. Affymax N. V.

5. táblázat  
Maszkírozás kivitele

Maradékok száma=3

1. maradék 3 építési blokk
2. maradék 4 építési blokk
3. maradék 5 építési blokk

Cellák száma=60

1. maradék maszkja
  - Sávok száma=1
  - Sávok szélessége=20 cella
  - 1. sáv eleje 1. helyzet, vége 20. helyzet
  - A 3 építési blokk mindegyikéhez a maszkot 20 cellával eltolni.
2. maradék maszkja
  - Sávok száma=3
  - Sávok szélessége=5
  - 1. sáv eleje 1. helyzet, vége 5. helyzet
  - 2. sáv eleje 21. helyzet, vége 25. helyzet
  - 3. sáv eleje 41. helyzet, vége 45. helyzet
  - A 4 építési blokk mindegyikéhez a maszkot 5 cellával eltolni.
3. maradék maszkja
  - Sávok száma=12
  - Sávok szélessége=1
  - 1. sáv eleje 1. helyzet, vége 1. helyzet
  - 2. sáv eleje 6. helyzet, vége 6. helyzet
  - 3. sáv eleje 11. helyzet, vége 11. helyzet
  - 4. sáv eleje 16. helyzet, vége 16. helyzet
  - 5. sáv eleje 21. helyzet, vége 21. helyzet
  - 6. sáv eleje 26. helyzet, vége 26. helyzet
  - 7. sáv eleje 31. helyzet, vége 31. helyzet
  - 8. sáv eleje 36. helyzet, vége 36. helyzet
  - 9. sáv eleje 41. helyzet, vége 41. helyzet
  - 10. sáv eleje 46. helyzet, vége 46. helyzet
  - 11. sáv eleje 51. helyzet, vége 51. helyzet
  - 12. sáv eleje 56. helyzet, vége 56. helyzet
  - Az 5 építési blokk mindegyikéhez a maszkot 1 cellával eltolni.

Copyright 1990, Affymax N. V.

A 9. ábra a hordozón lévő fluoreszcens jelölésű receptorok detektálására alkalmas fluoreszcens detektor egyik kiviteli alakját mutatja. A 112 hordozót egy 202 X/Y translációs táblára helyezük. X/Y translációs táblaként előnyösen alkalmazható a PM500-A1 nevű modell (Newport Corporation, USA). Az X/Y translációs tábla egy megfelelően programozott digitális 204 komputerhez kapcsolódik, és az szabályozza. Komputerként előnyösen alkalmazható valamely IBM PC/AT vagy AT kompatibilis komputer. Természetesen, más, speciális célú hardware-rel ellátott komputerrendszerek is alkalmazhatók a példaként említett AT komputer helyett. A translációs és adatgyűjtési funkciókhoz szükséges software a kereskedelmi forgalomban kapható software-ek, például a Lab Windows (National Instruments, USA) alapján könnyen előállítható.

A hordozó és az X/Y translációs tábla egy 206 mikroszkóp alatt helyezkedik el, amely egy vagy több 208 objektívet tartalmaz. Egy 210 lézer, amely lehet például egy 2020-05 modellszámú argonionlézer (Spectraphysics, USA) fénysugarát (mintegy 488 nm) egy dikroitikus 207 tükörön keresztül, amely visszaveri a 488 nm hullámhosszúságú fényt, de átengedi a legalább 520 nm hullámhosszúságú fényt, a hordozóra irányítjuk. A dikroitikus 207 tükör lehet például egy FT510 modellszámú tükör (Carl Zeiss, Németország). A tükör által visszavert fény belép a 206 mikroszkópba, amely lehet például egy Axioscop 20 modellszámú mikroszkóp (Carl Zeiss, Németország). A hordozón lévő fluoreszcens jelölésű anyag 488 nm hullámhosszúságnál nagyobb fénynél fluoreszkálni fog, és ezt a fluoreszcens fényt összegyűjti a mikroszkóp, majd a tükörön keresztül egy 209 hullámhosszszűrőre, és ezen keresztül egy 211 aperturalemezre vetíti. A 209 hullámhossz szűrő lehet például egy OG530 modellszámú szűrő (Melles Griot, USA), és a 211 aperturalemez lehet például egy 477352/477380 modellszámú lemez (Carl Zeiss, Németország).

A fluoreszcens fény ezután egy 212 fotonerősítőbe kerül, amely lehet például egy R943-02 modellszámú erősítő (Hamamatsu, Japán), majd a jelet egy 214 előerősítőben felerősítjük, és a fotonokat egy 216 foton-számlálóban számoljuk. A fotonok számát a 204 komputerben a hely függvényében tároljuk. A 214 előerősítő lehet például egy SR440 modellszámú erősítő (Stanford Research Systems, USA) és a 216 foton-számláló lehet például egy SR400 modellszámú számláló (Stanford Research Systems, USA). A hordozót ezután a következő helyzetbe állítjuk, és a folyamatot megismételjük. Előnyösen úgy járunk el, hogy minden 1–100  $\mu\text{m}$  távolságban adatot gyűjtünk egy előnyösen mintegy 0,8–10  $\mu\text{m}$  átmérőjű területről. Megfelelően intenzív fluoreszcens sugárzás esetén széles spektrumú CCD-detektor is alkalmazható.

Egy adott területen a lézer hatására generált fotonok számának meghatározásával lehetővé válik a hordozón található fluoreszcens jelölésű molekulák helyének azonosítása. Ennek következtében egy lemez felületén szintetizált polipeptidmátrix esetében lehetővé válik azok-

nak a polipeptideknek az azonosítása, amelyek komplexenterek a fluoreszcens jelölésű receptorral.

A hordozóra vetített fény intenzitását és időtartamát előnyösen a lézer energiájának és az ernyő helyzetének változtatásával szabályozzuk, és a fluoreszcens emisszió maximalizálásával és a háttérzaj minimalizálásával javítjuk a jel/zaj viszonyt.

A fentiekben jelölt receptorok detektálására alkalmas detektort ismertettünk, de a találmány szerinti megoldás más területeken is alkalmazható. Ennek következtében az ismertett detektor felhasználható katalizátorrendszerek, DNS és fehérjéjél vizsgálatára is.

A találmány szerinti megoldással kapott jel/zaj viszony olyan magas, hogy nemcsak egy ligandumhoz kötődő receptor jelenléte vagy távolléte mutatható ki, hanem vizsgálható egy adott receptornak különböző szekvenciákkal szemben mutatott relatív kötési affinitása is.

A gyakorlat azt mutatja, hogy egy receptor adott sorrendben különböző peptidszekvenciákhoz kötődik, de sokkal jobban kötődik néhány adott szekvenciához, mint a többihez. Az erős kötődési affinitást a jelen esetben az erős fluoreszcens vagy radiográfiás jel jelzi, mivel egy adott szakaszban sok receptormolekula kötődik az erősen kötő ligandumhoz. Ezzel ellentétben, a gyenge kötődési affinitást gyenge fluoreszcens vagy radiográfiás jel jelzi, mivel a hordozó egy adott szakaszában található, és az adott receptorra nézve kis kötési affinitást mutató ligandumhoz viszonylag kisszámú receptormolekula kötődik. Ez alapján az adott ligandumot tartalmazó részfelületen mérhető fluoreszcens vagy radiográfiás jel intenzitása segítségével meghatározható a ligandum relatív kötési affinitása.

A mosási körülmények és receptor koncentrációja változtatásával szemikvantitatív adatok nyerhetők az affinitásra. Ez például ismert ligandum/receptor párral történő összehasonlítást tesz lehetővé.

A találmány szerinti megoldást közelebbről az alábbi példákkal mutatjuk be. Az egyes műveleteket ellentétes megjelölés hiányában szobahőmérsékleten és légköri nyomáson hajtjuk végre.

#### A) példa

##### A lemez előállítása

A reakcióképes csoportok hozzáadása előtt a hordozót, amely előnyösen valamely üveghordozó, így mikroszkóplemez vagy fedőlap, megtisztítjuk. Ebből a célból a lemezt például 12 órán keresztül 1 liter 95 tömeg%-os etanoltól, 120 ml vízből és 120 g nátrium-hidroxidból álló lúgos fürdőben áztatjuk. A lemezeket ezután folyóvízben lemossuk, és levegőn szárítjuk, majd 95 tömeg%-os etanollal egyszer leöblítjük.

Ezután a lemezeket például amino-propil-trietoxiszilánnal amináljuk, és így az üveg felületéhez a kapcsolómolekulákon aminocsoportokat kapcsolunk. Emellett alkalmazható bármely omega-helyzetben funkciócsoportot hordozó szilán is. Az amino-propil-trietoxiszilánt általában 0,1 tömeg% koncentrációjú, előnyösen  $10^{-7}$ – $10$  tömeg% koncentrációjú, elsősorban  $10^{-3}$ – $2$  tömeg% koncentrációjú oldat formájában alkalmazzuk. A 0,1 tömeg% koncentrációjú oldat előállításá-

hoz 100 ml 95 tömeg%-os, vizes etanolhoz 100 µl amino-propil-trietoxi-szilánt adunk. Az elegyet egy rázóberendezésben mintegy 5 percen keresztül szobahőmérsékleten kevertetjük, majd a letisztított lemez egyik oldalára 500 µl elegyet adunk. 4 perc elteltével a lemezeket dekantáljuk, és háromszor 100%-os etanolba merítve leöblítjük.

Száradás után a lemezeket mintegy 20 percen keresztül 110–120 °C hőmérsékletű vákuumkamrába helyezzük, majd argonatmoszféra alatt mintegy 12 órán keresztül szobahőmérsékleten tartjuk. A lemezeket ezután DMF-oldatba merítjük, majd metilén-kloriddal alaposan átmoszuk.

A lemezek aminált felületét ezután mintegy 500 µl 30 mmol/l koncentrációjú, DMF-ben felvett NVOC-GABA (gamma-amino-vajsav) NHS (N-hidroxi-szukcinimid)-oldattal kezelve minden aminocsoporthoz egy NVOC-GABA részt kapcsolunk.

A felületet DMF-fel, metilén-kloriddal és etanollal mossuk.

A felületen lévő reagálatlan amino-propil-szilánt, vagyis azokat az aminocsoportokat, amelyekhez nem kapcsolódik NVOC-GABA, a további reagálás megakadályozása érdekében acetilcsoporttal lezárjuk. Ebből a célból a felületet 1 órán keresztül ecetsavanhidrid/piridin 1:3 arányú elegyével kezeljük. A lezáráshoz ecetsavanhidrid helyett alkalmazható trifluor-ecetsavanhidrid vagy hangyasav-ecetsavanhidrid is. Ezután a lemezeket ismét DMF-fel, metilén-kloriddal és etanollal mossuk.

#### B) példa

##### A és B monomerekből álló nyolc trimer előállítás

A 10. ábrán két monomer: gly és phe (a továbbiakban A és B monomer) felhasználásával előállított nyolc trimer lehetséges szintézisét mutatjuk be. Hordozóként 6-nitro-veratril-oxi-karboxamid (NVOC-NH) végcsoportokat hordozó sziláncsoportokkal ellátott üveglemezt állítunk elő. Reagensként a gly és phe aktív észterét (pentafluor-fenil, OBT vagy hasonló) alkalmazzuk, amelynek aminocsoportját NVOC segítségével védjük. Bár a jelen példára nem érvényes, megjegyezzük, hogy az alkalmazott monomer oldalláncában található védőcsoportra nem előírás, hogy a primer láncnál alkalmazott fény hullámhosszánál fotoreaktív legyen.

Egy  $n$  darabból álló monomerkészlet esetén az  $l$  hosszúságú összes lehetséges szekvencia előállításához  $n \times l$  ciklust kell végezni. Egy ciklus az alábbi lépésekből áll:

1. Megvilágítás egy megfelelő maszkon keresztül, amellyel a következő maradék megkötéséhez kijelölt helyen aktiváljuk az aminocsoportokat, ezután mosással eltávolítjuk az aktiválás melléktermékeit.
2. Az aktivált és (előnyösen ugyanazzal a fotokémiai módon eltávolítható csoporttal) védett monomert, amely csak az 1. lépésben kijelölt helyen lép reakcióba, hozzáadjuk, majd a reagens feleslegét mosással eltávolítjuk.

A fenti ciklust a monomerkészlet minden tagjával megismételjük addig, amíg a felület minden helyzet-

ben egy maradék kötődik. Eljárhatunk úgy is, hogy a különböző maradékokat egymás után azonos helyzetben adagoljuk, majd a következő helyzetre továbbhaladunk. A ciklusidőt általában a kapcsolási reakció rátája határozza meg, ami automatikus peptidszintetizáló berendezésekben mintegy 20 perc. Ezt a lépést adott esetben védőcsoport alkalmazása követi, és ezzel stabilizáljuk a sorrendet a következő vizsgálatokhoz. A polimerek egyes típusainál (például peptideknél) szükség lehet arra, hogy a teljes felszínről védőcsoportot (az oldalláncok fotokémiai módon eltávolítható védőcsoportjait) eltávolítsuk.

Az eljárást részletesebben 10. ábra segítségével mutatjuk be. Mint a 10A. ábrán látható a 20 üveglemez 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 és 36 részfelületekre van osztva. A 30, 32, 34 és 36 részfelületeket a 10B. ábra szerint maszkírozzuk, és az üveglemezt megvilágítjuk, és A monomerrel (például gly) reagáltatjuk. Ennek során a 10C. ábrán mutatott szerkezetet kapjuk. Ezután a 22, 24, 26 és 28 részfelületeket maszkírozzuk, az üveglemezt megvilágítjuk (lásd 10D. ábra) és a B monomert (például phe) tartalmazó reagenssel kezeljük, amelynek során a 10E. ábrán mutatott szerkezetet kapjuk. A folyamatot egymást követő maszkírozással és a részfelületek reagáltatásával a 10M. ábrán szereplő szerkezet eléréséig ismételjük. Az üveglemezt megvilágítjuk, és a terminális csoportokat kívánt esetben acetilezéssel lezárjuk. Mint az ábrán látható a gly/phe monomerpár valamennyi lehetséges trimerjét előállítottuk.

Ebben a példában oldallánci védőcsoportok eltávolítására nincs szükség. Amennyiben ilyenre szükség van, az oldallánci védőcsoportok etán-ditiollal és trifluor-ecetsavval eltávolíthatók.

Egy adott polimer lánc előállításához szükséges lépések száma általában az alábbi egyenlettel határozható meg:

$$n \times l \quad (1)$$

ahol

$n$  a monomerkészletben szereplő monomerek száma és

$l$  a polimer láncban szereplő monomer egységek száma.

Ennek megfelelően, a szintetizált  $l$  hosszúságú szekvenciák száma:

$$n^l \quad (2)$$

Természetesen nagyobb szórást kapunk olyan maszkírozási stratégiák alkalmazásával, amelyek lehetővé teszik  $l$ -nél rövidebb polimerek szintézisét is. Ha különleges esetben előállítjuk az összes,  $l$ -nél rövidebb és  $l$  hosszúságú polimert, akkor a kapott polimerek száma az alábbi egyenlettel határozható meg:

$$n^l + n^{l-1} + \dots + n^1 \quad (3)$$

A szükséges litográfiai lépések maximális száma minden monomer „rétegre” általában  $n$ , vagyis a maszkok (és ezáltal a litográfiai lépések) össz-száma  $n \times l$ . A maszk átlátszó részfelületeinek mérete a szintézishez alkalmazott hordozó területéhez és az előállított szekvenciák számához igazodik. A szintézisterület mérete általában az alábbi egyenlettel határozható meg:

$$\text{szintézisterület mérete} = (A)/(S),$$

ahol

A a szintézisre rendelkezésre álló összterület, és  
S az adott területen előállítani kívánt szekvenciák száma.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a fenti eljárás könnyen alkalmazható több ezer vagy több millió oligomer adott hordozón fotolitográfias módszerrel történő egyidejű előállítására. Ennek következtében, a megoldás lehetővé teszi például nagyszámú di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, oktapeptidok, dodekapeptidok vagy hosszabb polipeptidok (és hasonlóan polinukleotidok) gyors tesztelését.

A fenti példában az eljárást manuális megvalósítással mutattuk be. Az eljárás elvégezhető azonban automatizált vagy félig automatizált üzemmódban is. Ebből a célból a hordozót egy áramlócellában helyezük el, és automatikusan adagoljuk és távolítjuk el a reagenseket. Ez lehetővé teszi a reagens térfogatának csökkentését és a reakciókörülmények pontos szabályozását. A maszkírozás szintén megvalósítható manuálisan is és automatikusan is.

#### C) példa

*Egy aminopropilcsoportot és egy fluoreszcenscsoportot tartalmazó dimer előállítása*

Az egy aminopropilcsoportot és egy fluoreszcenscsoportot tartalmazó dimer előállításához hordozóként funkciócsoportot hordozó durapore membránt alkalmazunk. A durapore membrán egy polivinilidindifluorid, amely amino-propil-csoportokat tartalmaz. Az amino-propil-csoportokat DDZ-csoporttal védjük, amelyhez a karbonil-kloridot az aminocsoporttal reagáltatjuk. A reakció az ismert módon megvalósítható. A fenti csoportokat hordozó felületet THF-oldatba merítjük, és 1 mm-es átlátszatlan és átlátszó részfelületek mintáját tartalmazó maszkkal érintkeztetjük. A maszkot egészen 280 nm hullámhosszig terjedő ultrabolya fényel mintegy 5 percen keresztül szobahőmérsékleten megvilágítjuk, bár a megvilágítás időtartama és hőmérséklete széles határok között változtatható. Ennek megfelelően, a megvilágítási idő általában mintegy 1–5000 másodperc, hőmérséklete  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  és  $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$  közötti.

A megvilágítást előnyösen mintegy 1–500 másodpercen keresztül szobahőmérsékleten végezzük. Bizonyos esetekben a párolgás megakadályozása érdekében a megvilágítást nyomás alatt végezzük.

A membrán felületét ezután mintegy 1 órán keresztül egy fluoreszcens jelölésű mintával mossuk, amely egy lantanidakeláthoz kötött aktív észteret tartalmaz. A mosási idő széles határok között változtatható, értéke általában néhány perc és néhány óra között változik. Ezek az anyagok a vörös és a szürke látható tartományban fluoreszkálnak. A fluoroforban lévő aktív észter reakciójának befejeződése után azok a helyek, ahol a fluorofor megkötődött, ultrabolya fényel történő besugárral és a vörös és zöld fluoreszcens fény megfigyelésével láthatóvá tehetők. Megfigyelhető, hogy a hordozó valamely származékot hordozó szakaszai erősen megközelítik a maszk eredeti mintáját.

#### D) példa

*A jel kimutathatóságának vizsgálata*

A jel kimutathatóságát alacsony szintű standard fluoreszcens gyöngy (Flow Cytometry Standarda, USA, modellszám 824) segítségével mutatjuk ki. A készlet  $5,8\text{ }\mu\text{m}$  átmérőjű gyöngyökből áll, amelyek ismert számú fluoreszcens molekulával vannak bevonva.

Az egyik gyöngyöt a 9. ábra szerinti vizsgálati ernyőre helyezük az ideiglenesen letakart lézertény útjába. Elhelyezés után bekapcsoljuk a fotondetektort. A lézersugárral megvilágítjuk a gyöngyszemet, amelynek hatására az fluoreszkálni kezd. A 7000 és 29 000 fluoreszcens molekulával impregnált gyöngyök fluoreszcens görbét a 11A. és 11B. ábrán adjuk meg. Mindkét görbén megtalálhatók a fluoreszcens molekulák nélküli gyöngyök nyomai. A kísérletet 488 nm hullámhosszúságú fényel  $100\text{ }\mu\text{W}$  lézer energiával végeztük. A fényt egy 40-es energiájú 0,75 NA objektívvel fókuszáltuk.

A fluoreszcens fény intenzitása minden esetben magas értéken indul, majd exponenciálisan csökken. Az intenzitás kiesése a fluoreszcens molekula fotoelfehéredéséből származik. A fluoreszcens molekulák nélküli gyöngyök nyomát háttérként alkalmazzuk. A jelölt és jelöletlen gyöngyök kezdeti exponenciális csökkenése közötti különbség integrálásával megkapjuk a fotonok össz-számát, és ez a szám a gyöngyönkénti molekulák számára utal. Ebből kiszámítható a fluoreszcens molekulánként detektált fotonok száma. A 11. ábrán szereplő görbéből látható, hogy fluoreszcens molekulánként mintegy 40–50 foton kisugárzásával számolhatunk.

#### E) példa

*Molekulák felületegységre vonatkoztatott számának meghatározása*

A fent leírt módon amino-propilezett üveg mikro-szkóplemezt állítunk elő a lemez jelölési sűrűségének meghatározásához. A lemez szabad aminoterminális csoportjait FITC-vel (fluoreszcens izotiocianát) reagáltatjuk, amely kovalens kötést hoz létre az aminocsoporttal. A lemezt vizsgálva ezután meghatározzuk egy olyan részfelületen belül generált fluoreszcens fotonok számát, amely a fluoreszcens molekulánként becsült 40–50 foton figyelembevételével lehetővé teszi a felület egységnyi területére eső molekulák számának meghatározását.

A felületén amino-propil-szilánnal ellátott lemezt szobahőmérsékleten 1 órán keresztül az FITC 1 mmol/l koncentrációjú, DMF-ben felvett oldatába merítjük. A reagáltatás után a lemezt kétszer DMF-fel, majd etanollal, vízzel és ismét etanollal mossuk. Ezután megszáritjuk, és a vizsgálat megkezdéséig sötétben tároljuk.

A 11. ábrán szereplő görbéhez hasonló görbék alkalmazásával, és az exponenciálisan csökkenő jel alatti fluoreszcensszám integrálásával meghatározzuk a felületen a származékképzés után található szabad aminocsoportok számát. A vizsgálatok szerint reprodukálható módon előállíthatók olyan lemezek, amelyek jelölési sűrűsége  $10^3 \times 10^3\text{ nm}^{-2}$ -től mintegy  $2 \times 2\text{ nm}^{-2}$ -ig változó területre számolva 1 fluoreszcens molekula, tehát az amino-propil-trietoxi-szilán koncentrációja  $10^{-5}$ – $10^{-10}\%$  között változhat.



*F) példa**Az NVOC eltávolítása és egy fluoreszcens marker megkötése*

Az NVOC-GABA csoportokat a fent leírt módon megkötjük. A lemez teljes felületét megvilágítva szabad aminocsoportot alakítunk ki a gamma-aminovajsav végén. A lemezt, és egy hasonló aktiválatlan lemezt fluoreszcens izotiocianáttal (FITC) kezeljük.

A 12A. ábra az aktiválatlan lemezről az FITC-kezelés után felvett görbét mutatja. Az X tengelyre az időegységeket és az Y tengelyre a fotonszámot vettük fel. A görbe bizonyos mértékű háttér fluoreszcens sugárzás jelenlétére utal. A második lemezt mintegy 1 percen keresztül 350 nm-es széles sávú fényvel (12 mW/cm<sup>2</sup>) sugároztuk be, majd mostuk, és FITC-vel reagáltattuk. A lemez fluoreszcensgörbéjét a 12B. ábra mutatja. A fluoreszcens sugárzás nagymértékű növekedése figyelhető meg, ami arra utal, hogy a fotolízis egy sor aminocsoportot aktivált a lemez felszínén, és így lehetővé tette a fluoreszcens marker megkötését.

*G) példa**Maszk alkalmazása az NVOC eltávolításában*

A következő kísérletet 0,1%-ban amino-propilezett lemezzel végeztük. Egy Hg-Xe ívlámpa fényét egy lézerrel megmunkált krómüveg maszkon keresztül, amely közvetlen érintkezésben van a hordozóval, a hordozóra irányítjuk.

A lemezt mintegy 5 percen keresztül 12 mW intenzitású 350 nm-es széles sávú fényvel világítjuk meg, majd 1 mmol/l FITC oldattal reagáltatjuk. Ezután a lézer-detektorkészülékbe helyezzük, és felvesszük a szinkódolt fluoreszcens sugárzás intenzitásának két-dimenzionális görbéjét. A kísérletet különböző maszkokkal többször megismételjük. A 100 × 110 μm-es maszkkal, az 50 μm-es maszkkal, a 20 μm-es maszkkal és a 10 μm-es maszkkal felvett fluoreszcensgörbe azt mutatja, hogy a maszk mintája legalább mintegy 10 μm-es négyzetben már megkülönböztethető ennél a litográfias technikánál.

*H) példa**YGGFL megkötése, majd Herz antitest és kecske-antieger megkötése*

Annak igazolására, hogy egy adott polipeptidszekvenciára vonatkozó receptor hozzákötődik a felületen képzett peptidhez, és ott kimutatható, Leu enkefalint kapcsoltunk a felülethez, majd a felismeréshez antitestet adagoltunk. Egy lemezt 0,1 tömeg% aminopropil-trietoxi-szilánnal kezeltünk, és NVOC-csoporttal védünk. Egy 500 μm-es rácson maszkot alkalmaztunk a lemez aktiválására, amit áramlócellában hátoldali érintkezéssel végeztünk. A Leu enkefalin szekvenciát (H<sub>2</sub>N-tirozin-glicin-glicin-fenilalanin-leucin-CO<sub>2</sub>H, a továbbiakban YGGFL) karboxiterminális végével a lemez felületén található aminocsoportokhoz kötöttük. A peptidet DMF-oldatban BOP/HOBT/DIEA kapcsolóreagensekhez adagoltuk, és 2 órán keresztül szobahőmérsékleten az áramlócellában keringtettük.

A lemez felületét ezután 45 percen keresztül 2 μg/ml, szuperkóktélban felvett Herz antitesttel kezel-

tük (a szuperkóktél 1 tömeg% BSA-t és 1 tömeg% ovalbumint tartalmaz). A lemezre ezután 2 μg/ml, szuperkóktélpufferben felvett kecske-antieger fluoreszcens konjugátumot vezetünk, és 2 órán keresztül inkubáltuk.

A vizsgálat eredményeként a fluoreszcens sugárzás intenzitását a hely függvényében detektáltuk. A detektálást 10 μm-es lépésekben végeztük, és az eredmények szerint nemcsak a védőcsoport eltávolítása végezhető jól definiált minta szerint, hanem (1) a megoldás eredményesen alkalmazható peptideknek a hordozó felületén történő megkötésére, (2) a felületen kötött peptid alkalmas antitest megkötésére, és (3) a detektorkészülék teljesítménye elegendő a receptor kötődésének kimutatására.

*I) példa**YGGFL monomerenként történő előállítás és jelölt antitest megkötése*

Az YGGFL és GGFL monomerenként történő szintézisét váltakozó négyzetekben rácson mintázattal ellátott lemezen végeztük, majd a lemezt Herz antitesttel kezeltük. A kísérletet a 13A. és 13B. ábra mutatja.

A 13A. ábra a lemezt mutatja, amelyhez t-BOC-csoporttal (terc-butoxi-karbonil-csoporttal) védett aminopropil-csoportokat kapcsoltunk. A lemezt TFA-val kezelve eltávolítottuk a t-BOC védőcsoportokat. Az aminopropil-csoportokhoz ezután aminocsoportján t-BOC-csoporttal védett E-amino-kaprónsavat kapcsoltunk. Az amino-kaprónsav megfelelő térközt biztosít az amino-propil-csoport és a szintetizált peptid között. Az amino-kaprónsav aminocsoportjáról eltávolítjuk a védőcsoportot, majd NVOC leucinnal kapcsoljuk. A teljes lemezt ezután 12 mW erősségű 325 nm-es széles sávú fényvel besugározzuk. A lemezt ezután NVOC fenilalaninnal kapcsoljuk, és mossuk. Ismét besugározzuk a teljes lemezt, majd NVOC glicinnel kapcsoljuk, és mossuk. Ismét besugározzuk az egész lemezt és NVOC glicinnel kapcsolva megkapjuk a 13A. ábra utolsó szakaszán szereplő szekvenciát.

Mint a 13B. ábrán látható, a lemez váltakozó részfelületeit ezután egy 500 × 500 μm-es rácson maszk alkalmazásával megvilágítjuk, amelynek során csak a megvilágított részfelületeken található glicin aminocsoportja aktiválódik. A következő kapcsolási lépésben NVOC-tirozint alkalmazunk, és ez csak a megvilágított területeken kötődik. A teljes lemezt ezután megvilágítjuk, és eltávolítjuk az NVOC csoportokat, amikor is a megvilágított részterületeken YGGFL peptidet, a többi részterületen GGFL peptidet kapunk. A Herz antitestet (amely felismeri az YGGFL peptidet, de nem ismeri fel a GGFL peptidet) hozzáadjuk, majd kecske-antieger fluoreszcein konjugátummal kezeljük.

A fluoreszcensfelvétel sötét foltokat mutat, amelyek GGFL tetrapeptidet tartalmaznak, amelyeket nem ismert fel a Herz antitest (és ezért nem kötik a fluoreszcein konjugátummal ellátott kecske-antieger antitest sem), a vörös foltokban YGGFL található. Az YGGFL pentapeptidet felismerte a Herz antitest, és ezeken a területeken a fluoreszcein konjugált kecske-antieger antitest is kötődik.

Egy azonos mintájú 50 µm-es maszk közvetlen érintkeztetésével a hordozón olyan mintát alakíthatunk ki, amely jobban megkülönböztethető, és a rácsos minta megfelel a hordozóval érintkeztetett maszknak (ami az eljárás feloldóképességének növekedésére utal).

*J) példa*

*YGGFL és PGGFL monomerenként történő szintézise*

Egy 50 µm-es rácsos maszk alkalmazásával megismételjük a 13. ábrán szereplő eljárást azzal a különbséggel, hogy a hordozón lévő GGFL-helyekre egy további kapcsolási lépésben P monomert adunk. A P monomer hozzáadásához a védett GGFL peptidet maszkon keresztül megvilágítjuk, és a fent leírt módon a P monomerrel kezeljük. Ennek következtében a hordozó részfelületeinek fele YGGFL peptidet, a fennmaradó fél PGGFL peptidet tartalmaz.

A fluoreszcensfelvétel igazolja, hogy jól megkülönböztethetők azok a részfelületek, ahol a kötődés létrejön. A kísérlet igazolja továbbá, hogy az antitestek egy speciális szekvenciát ismernek fel, és a felismerés nem függ a szekvencia hosszától.

*K) példa*

*YGGFL és YPGGFL monomerenként történő előállítás*

A találmány szerinti megoldás használhatóságának további bemutatására egy 50 µm-es rácsos mintában felváltva YGGFL és YPGGFL peptidet állítunk elő egy hordozón a fent leírt módon. A kapott fluoreszcensfelvétel azt mutatja, hogy az antitest világosan felismeri az YGGFL szekvenciát, és nem kötődik az YPGGFL szakaszokhoz.

*L) példa*

*Tizenhat különböző aminosavszekvenciából álló sorozat előállítása és a Herz antitest relatív kötési affinitásának meghatározása*

A fent leírtakkal analóg módon tizenhat különböző aminosavszekvenciából álló sorozatot (négyeszeres ismétlés) állítunk elő két üveghordozón. A szekvenciák előállításához egy NVOC-GFL szekvenciát kapcsolunk a lemez teljes felületén. Különböző maszkok alkalmazásával ezután szelektíven két réteg aminosavat kötünk meg a hordozón. Mindegyik részfelület mérete 0,25 × 0,0625 cm. Az első lemez csak L aminosavakból álló aminosavszekvenciákat tartalmaz, míg a második lemez D aminosavakat is tartalmaz. A 14A. és 14B. ábra a különböző részfelületek elhelyezkedését mutatja az első és második lemezen. A 14A. és 14B. ábrán szereplő minták négyszer ismétlődnek minden lemezen. A lemezeket ezután Herz antitesttel és fluoreszcens jelölésű kecske-antigén antitesttel kezeljük.

A csak L aminosavakat tartalmazó első lemez fluoreszcensfelvétele vörös és fekete területeket tartalmaz. A vörös terület a Herz antitest erős kötődését (legalább 149 000 foton), a fekete terület az antitest gyenge kötődését vagy az antitest kötődésének elmaradását (legfeljebb 20 000 foton) mutatja. Ebből következik, hogy az

YGGFL szekvenciát az antitest könnyebben felismeri. Az YAGFL és YSGFL szekvenciák szintén erősen megkötik az antitestet. Ezzel ellentétben a legtöbb fennmaradó szekvencia csak gyenge kötődést vagy a kötődés teljes elmaradását mutatja. Mind a négy azonos peptidet tartalmazó részfelület teljes összhangban van a fenti kötési mintával.

A D aminosavakat tartalmazó lemez fluoreszcensfelvétele azt mutatja, hogy a legerősebb kötés az YGGFL szekvenciával alakul ki. Szignifikáns kötés mutatható ki továbbá az YaGFL, YsGFL és YpGFL szekvenciákkal. A fennmaradó szekvenciák gyenge kötést mutatnak. Alacsony kötési affinitás mutatható ki az yGGFL szekvenciával.

A 6. táblázatban a relatív kötési affinitásra utaló relatív fluoreszcens intenzitás vizsgálatánál felhasznált különböző szekvenciákat adja meg.

6. táblázat

L-aminosavak	D-aminosavak
YGGFL	YGGFL
YAGFL	YaGFL
YSGFL	YsGFL
LGGFL	YpGFL
FGGFL	fGGFL
YPGFL	yGGFL
LAGFL	faGFL
FAGFL	wGGFL
WGGFL	yaGFL
	fpGFL
	waGFL

*M. példa*

*Oligonukleotid előállítása*

Timidin-citidin dimert állítunk elő fénytel történő aktiválással. Egy háromdimenziós fluoreszcens képernyőként (a harmadik dimenzió a fluoreszcens intenzitás) 7 × 4 négyzetből álló sakkábramintát alakítunk ki. A hordozóhoz 5'-nitro-veratril-timidint kapcsolunk a 3'-hidroxilcsoporton keresztül. A védőcsoportként szolgáló nitro-veratril-csoportot az 500 µm-es sakkábramintán keresztül végzett besugárzással eltávolítjuk. A hordozót ezután foszforamidittal aktivált 2'-deoxicitidinnel kezeljük. A reakció fluorometrikus követéséhez a deoxi-citidint egy FMOC-védett amino-hexilcsoporthoz, mint kapcsoló csoporthoz kötött exociklikus aminnal módosítjuk [5'-O-dimetoxi-tritil-4-N-(6-N-fluorenil-metil-karbamoil-hexil-karboxi)-2'-deoxicitidin]. Az FMOC védőcsoport bázissal történő eltávolítása után a dinukleotidot tartalmazó részfelületeket fluoreszcens jelöléssel azonosítjuk, amelyhez a hordozót 1 mmol/l FITC-vel kezeljük DMF-ben 1 órán keresztül.

A fluoreszcens adatok háromdimenziós megjelenése a sakkábramintának megfelelően váltakozó fényes négyzeteket mutat. Ez az eredmény igazolja, hogy a ta-

lálmány szerinti eljárással peptidekhez hasonlóan oligonukleotidok is szintetizálhatók.

*N) példa*

*Trinukleotid előállítása*

Timidin-citidin-citidin trinukleotidot állítunk elő. Ennek során az előző példához hasonlóan 5'-nitro-veratril-timidint kapcsolunk foszforamidit-kötéssel a felületén bisz(2-hidroxi-etil)-3-amino-propil-sziloxánt tartalmazó hordozóhoz. A lemezt dioxán jelenlétében 10 percen keresztül egységiesen besugározzuk (362 nm, 14 mW/cm<sup>2</sup>). Szárítás után a felületet N<sub>4</sub>-dimetoxi-tritil-5'-nitro-veratril-2'-dezoxi-citidin-3'-O-(2-ciano-etil)-N,N-diizopropil-foszforamidittal kezeljük tetrazol jelenlétében (szokásos foszforamidit kapcsolás). Oxidálás és szárítás után ismét besugározzuk azzal az eltéréssel, hogy egy 500 µm-es sakkáblamintát helyezünk a fényforrás és a lemez közé. A felületet ezután 5'-O-(4,4'-dimetoxi)-N-4-(6-((biotinil)-amino)-hexanoil)-amino)-hexanoil)-amino-hexil)-5-metil-2'-dezoxi-citidin-3-O-(2-ciano-etil)-N,N-diizopropil-foszforamidittal kezeljük tetrazol jelenlétében. Oxidálás és szárítás után a trinukleotidot tartalmazó részfelületeket fluoreszcens jelöléssel látjuk el, amihez FITC-vel jelölt streptavidinnel kezeljük. A fluoreszcens adatok váltakozó fényes és sötét kockákat mutatnak a besugárzásnál használt 500 µm-es sakkáblamintának megfelelően.

*O) példa*

*12 nukleotidból álló poliadenin oligomer előállítása*

Ebben a példában 12 nukleotidból álló poliadenin oligomert állítunk elő, és egy politimidinmintával hibridizáljuk.

A szintézishez 10 darab 2,54 × 7,62 cm lemezt 1 tömeg% koncentrációjú, 96%-os etanolban felvett bisz(2-hidroxi-etil)-amino-propil-trietoxi-szilán-oldattal töltött műanyag edényben inkubálunk szobahőmérsékleten és egy éjszakán keresztül. A lemezeket ezután etanollal alaposan átöblítjük, N<sub>2</sub> alatt megszáritjuk, 110 °C hőmérsékleten 1 órán keresztül hőkezeljük, majd vákuumexszikkátorban hagyjuk lehűlni. A felületi kapcsolómolekula kialakításához 0,2 mol/l monodimetoxi-tritil-pentaetilnglikol-β-ciano-etil-foszforamidit vízmentes acetonnitrilben felvett oldatát azonos térfogatú 0,45 mol/l tetrazol acetonnitrilben felvett oldatával keverjük egy üvegfolyóban. A kapott oldatból 0,35 ml részletet viszünk fel az egyes lemezek felületére, majd 3 percen keresztül inkubáljuk. A lemezeket ezután röviden acetonnitrillel öblítjük, és a kapcsolást frissen előállított foszforamidittal megismételjük. Ezután a foszfit-triészter-kötést foszfo-triészter-kötéssé oxidáljuk, amihez a lemezeket 0,1 mol/l jóddal (2,6 g jóddal, 80 ml tetrahidrofurán, 20 ml 2,6-lutidin, 2 ml víz) töltött edénybe merítjük 1 percen keresztül, majd acetonnitrillel alaposan leöblítjük és N<sub>2</sub> alatt szárítjuk. A védőcsoportként szolgáló dimetoxi-tritilcsoportok eltávolításához a lemezeket 3 tömeg% diklór-ecetsav metilén-kloridban felvett oldatába merítjük 30 másodpercen keresztül, majd acetonnitrillel leöblítjük és N<sub>2</sub>

alatt szárítjuk. A C és D lépéseket 0,2 mol/l 5'-nitro-veratril-dezoxi-timidin-3-β-ciano-etil-foszforamidittal megismételjük. A lemezeket ezután 1 órán keresztül lezáró oldattal (75 ml 6,5 tömeg% DMAP/THF és 25 ml 40 tömeg% ecetsavanhidrid/60 tömeg% 2,6-lutidin) inkubáljuk, majd acetonnitrillel alaposan leöblítjük, N<sub>2</sub> alatt szárítjuk és sötétben, vákuum alatt tároljuk.

A poli-dezoxi-adenint (poli-dA<sub>12</sub>) ABI-szintetizátorban állítjuk elő 1 µmol 3-amino-ON CPG (Glen Research) és a végén dimetoxi-tritil-csoportot (DMT) hordozó standard ABI 1 µmol-os kapcsolási ciklus segítségével. A CPG-t 1,5 ml-es, csavaros tetejű műanyag fiolába visszük át, és 1,0 ml koncentrált ammónium-hidroxidot adunk hozzá. Az elegyet 18 órán keresztül 55 °C hőmérsékleten inkubálva az oligomert lehasítjuk a gyantáról és eltávolítjuk az exociklikus amin védőcsoportot. A nyers oligomert PolyPak berendezésen (Glen Research) tisztítjuk a gyártó előírásai szerint. A megfelelő frakciókat összegyűjtjük és vákuumban szárítjuk. Az oligomert 0,9 ml vízben oldjuk, amihez 0,1 ml 10X jelölő puffert (1,0 mol/l nátrium-hidrogén-karbonát/nátrium-karbonát, pH=9,0) és 0,25 ml frissen előállított 100 mg/ml FITC/DMF elegyet adunk. Az oldatot összekeverjük, és egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. A reakcióelegyet 1 × 30 cm Sephadex G-25 oszlopon mobil fázisként vízzel tisztítjuk, és a megfelelő frakciókat összegyűjtjük és vákuumban szárítjuk. PAGE-analízis szerint a reakció nem 100%-os. A fluoreszcenccel jelölt oligomert reverz fázisú HPLC-eljárással (Hamilton PRP-1 félépreparatív oszlop) 10-40% acetonnitril/0,1 mol/l trietil-amin-acetát (pH=7,6) gradienccel 45 perc alatt 2 ml/perc áramlási sebesség mellett tovább tisztítjuk. A frakciókat PAGE-analízissel ellenőrizzük, és a megfelelő frakciókat összegyűjtjük és vákuumban szárítjuk. A végtermék PAGE-analízis alapján mintegy 99% tisztaságú.

Egy megfelelően előkészített lemezt egy négykamrás áramlási cellába helyezünk (mintegy 1,5 cm átmérőjű kerek mérőhelyek). Az egyik mérőhelyre dioxánt töltünk. Az összes többi mérőhelyet fekete elektromos szigetelőszalaggal lefedjük. A lemezt ezután 365 nm-es fényel kezeljük 11,8 mW/cm<sup>2</sup> értéken és 12 percen keresztül a fotovédőcsoport eltávolításához. Az áramlási cellát egy ABI DNS-szintetizátorhoz (392 modell) csatlakoztatjuk, és a felülethez 5'-NV-dT-OCEP-t kötünk módosított megkötő ciklussal (03 felhasználói ciklus). Lezárólépést nem végzünk, mert a foszforamidit feleslegben alkalmaztuk. A fotolízis/szintézis ciklust poli(dT)<sub>12</sub>-OH előállításáig ismétjük. A lemezt ekkor eltávolítjuk az áramlási cellából, acetonnitrillel alaposan átöblítjük, és N<sub>2</sub> alatt szárítjuk. A lemezt 3 tömeg% BSA-val és 0,025 tömeg% triton X-100-zal kiegészített 6X SSPE-vel 30 percen keresztül inkubáljuk. Ezután ugyanabban a puffertben felvett 20 ng/ml 5'-O-poli(dA)<sub>12</sub>-fluoreszcenccel töltött műanyag edénybe visszük és szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáljuk. A lemezt 20 mmol/l nátrium-klorid-oldattal röviden átöblítjük, N<sub>2</sub> alatt szárítjuk, és közös fókuszu mikroszkóppal vizsgáljuk. Az átlagos fotonszám a mérőhelyen nyolcszor nagyobb, mint a háttér. A lemezt

egy éjszakán keresztül 500 ml 1X SSPE-ben 40 °C hőmérsékleten inkubáljuk, leöblítjük és vizsgáljuk. A középpontban mérhető fényes kör arra utal, hogy a mosás eltávolította a jelet. A próbát a fent leírt módon visszaállítva az eredetivel azonos intenzitást kapunk.

Az 59-8b-1, -2 és -3 számú mintáknál az átlagos intenzitás  $347 \pm 25$ ,  $211 \pm 23$  és  $223 \pm 13$  a háttérhez viszonyítva. Az 59-8b-1 és 59-8b-3 számú mintáknál a mérőhelyen mért jel  $4545 \pm 476$  és  $237 \pm 308$ , ezért az 1-es számú mintánál a jel/háttér arány 13, a 3-as számú mintánál 11. Az 59-8b-1 számú minta az első próba, az 59-8b-2 számú minta a 40 °C hőmérsékleten végzett inkubálás utáni vizsgálat és az 59-8b-3 számú minta a visszaállított minta.

A találmány szerinti megoldás megvalósítható úgy is, hogy a felülethez lezárt kötőelemeket kapcsolunk, amelyek lezárt formában viszonylag kis affinitást mutatnak más potenciális kötőelemek, így receptorok vagy specifikus kötőanyagok vonatkozásában. Ezt a technikát közelebbről ismerteti a 404 920 számú USA-beli szabadalmi bejelentés.

Az említett változat értelmében egy szilárd hordozóanyag felületén olyan előre meghatározott részfelületeket alakítunk ki, amelyek képesek receptorok immobilizálására. Ebből a célból lezárt kötőelemeket kapcsolunk a felülethez, ami lehetővé teszi a meghatározott részfelületek szelektív aktiválását. A lezárt kötőelemeket felszabadítva azok megkötik a receptorokat a szelektíven aktivált meghatározott részfelületeken. Az aktivált kötőelemekkel immobilizáljuk a kívánt molekulákat, így receptorokat a felület előre meghatározott részfelületein. Az eljárást a felület azonos vagy más helyein többször megismételve olyan felületet kapunk, amely például azonos vagy különböző receptorokat tartalmazó részfelületek sokaságából áll. Ha az ily módon immobilizált receptorok egy vagy több ligandum vonatkozásában különböző affinitást mutatnak, a ligandumok a receptorokat tartalmazó részfelületeken vizsgálhatók.

Ez a változat lehetővé teszi a felülethez kapcsolt új lezárt kötőelemek alkalmazását. A lezárt (aktiválatlan) kötőelem viszonylag alacsony affinitást mutat az olyan receptorok vonatkozásában, amelyek specifikusan kötődnek a lezárt kötőelemekhez. Ennek megfelelően, a kötőelemek a reakciókkal szemben védve vannak addig, amíg a felület aktiválható részfelületeit megfelelő energiaforrás segítségével aktiváljuk. A megfelelő energiaforrással végzett aktiválás során a zárócsoport lehasad, és aktivált kötőelem marad vissza. Energiaforrásként előnyösen alkalmazható a fénysugárzás.

A felületen lévő kötőelemek aktiválásuk után receptorhoz kapcsolhatók. Receptorként alkalmazható például monoklonális antitest, nukleotidszekvencia vagy valamely gyógyszerhatóanyag-receptor. A receptort előnyösen, de nem mindig, úgy állítjuk elő, hogy elősegítsük annak a kötőelemhez történő közvetlen vagy közvetett kötését. Így például egy speciális kötőanyag, amely erős kötődési affinitást mutat a kötőelemhez, és erős affinitást mutat a receptorhoz, vagy valamely receptor konjugátumhídként szolgálhat a kötőelem és a receptor között. Az eljáráshoz olyan receptort alkalma-

zunk, amely aktivitását egy adott ligandum vonatkozásában megőrzi.

A szilárd hordozóhoz kötött lezárt kötőelem lehet például valamely fotokémiaiilag aktiválható biotin-komplex, vagyis olyan biotinmolekula, amelyet fotokémiaiilag lehasítható védőcsoporttal kémiaiilag módosítottunk úgy, hogy a természetes biotinhoz képest lényegesen csökkentett kötési affinitást mutat az avidinhez és az avidinanalógokhoz. Előnyösen úgy járunk el, hogy a felület meghatározott részfelületén elhelyezkedő védőcsoportokat megfelelő sugárzással eltávolítjuk, és így megkapjuk a kötőelemet, amely lehet például biotin vagy ennek funkciós analógja, amely a biotinnal lényegében azonos kötési affinitást mutat az avidinhez vagy avidinanalógokhoz.

Eljárhatunk úgy is, hogy a felületen lévő aktivált kötőelemeket avidinnel vagy avidinanalóggal inkubáljuk addig, amíg az avidin erősen kötődik a kötőelemhez. A felület előre meghatározott részfelületein ily módon immobilizált avidin a kívánt receptorral vagy annak konjugátumával inkubálható. Ha a felület előre meghatározott részfelületein avidint immobilizáltunk, akkor a receptor könnyen biotinileződik. Eljárhatunk továbbá úgy is, hogy a felület aktivált kötőelemeihez egy avidin/biotinilezett receptor-komplexet kapcsolunk.

A találmány egy jelentős mértékben javított eljárást és készüléket javasol polimereknek hordozón történő előállítására. Megjegyezzük, hogy a leírás a találmány bemutatására szolgál, és nem korlátozó jellegű. A leírásban megadott kitanítás alapján szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány különböző módokon megvalósítható. Így például, a megoldást elsődlegesen fotokémiaiilag eltávolítható védőcsoportok alkalmazásával mutattuk be, de szakember számára nyilvánvaló, hogy a fénytől eltérő egyéb sugárforrások is felhasználhatók. Így például bizonyos esetekben előnyös lehet olyan védőcsoportok alkalmazása, amelyek elektronnyaláb-sugárzásra vagy röntgensugárzásra érzékenyek, és ilyen esetben elektronnyaláblitográfias vagy röntgensugár-litográfias technikát alkalmazunk. Alternatív módon, a védőcsoport eltávolítható elektromos áram útján is. A találmány oltalmi körét ezért nem a fenti leírás határozza meg, hanem a mellékelt igénypontok és az igénypontok alapján felhozható ekvivalensek teljes köre.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás nagyszámú különféle polipeptid aminosavakból, valamint oligonukleotid nukleotidokból lépésenkénti szintézissel történő előállítására és azonosítására egy hordozó meghatározott részfelületein, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi lépéseket hajtjuk végre:

a hordozó egyik, fénysugárzással eltávolítható védőcsoportokkal védett funkciós csoportokkal ellátott felületének egy első meghatározott részfelületét besugárzva eltávolítjuk a védőcsoportokat;

a felületet egy első aminosavval vagy nukleotiddal érintkeztetve az aminosavat vagy nukleotidot az első meghatározott részfelületen található funkció csoportokhoz kapcsoljuk, ahol az aminosav vagy nukleotid fénysugárzással eltávolítható védőcsoporttal védett funkció csoporttal rendelkezik;

a hordozó egyik felületének egy második meghatározott részfelületét besugározva eltávolítjuk a védőcsoportokat, ahol a második meghatározott részfelület az első meghatározott részfelülettel azonos vagy attól eltérő;

a felületet egy második aminosavval vagy nukleotiddal érintkeztetve az aminosavat vagy nukleotidot a második meghatározott részfelületen található funkció csoportokhoz kapcsoljuk, ahol a második aminosav vagy nukleotid az első aminosavval vagy nukleotiddal azonos vagy attól eltérő, és fénysugárzással eltávolítható védőcsoporttal védett funkció csoporttal rendelkezik;

majd további besugárzási és aminosavval vagy nukleotiddal történő érintkeztetési és kapcsolási lépéseket végzünk a kívánt nagyszámú különféle polipeptid vagy oligonukleotid kialakításáig, melynek során az első meghatározott részfelület és a második meghatározott részfelület közül legalább egyet és legalább részben besugárzunk a további érintkeztetési és kapcsolási lépések legalább egyikében, ahol a polipeptidek vagy oligonukleotidok az említett felületen helyezkednek el, és a besugárzási lépések során kialakított besugárzási minta, valamint az érintkeztetési és kapcsolási lépések során megkötött egyedi aminosavak vagy nukleotidok által definiált szekvenciával rendelkeznek, azzal a megszorítással, hogy az egyes szekvenciákban található terminális aminosavak vagy nukleotidok fénysugárzásnak ellenálló védőcsoportot hordoznak,

majd a biológiailag hatásos polipeptid(ek)et vagy oligonukleotid(ok)at azonosítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy legalább 100 különféle polipeptidet vagy oligonukleotidot állítunk elő.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy legalább 1000 különféle polipeptidet vagy oligonukleotidot állítunk elő.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a különféle polipeptideket vagy oligonukleotidokat legfeljebb mintegy 0,1 cm<sup>2</sup> területű különböző részfelületeken állítjuk elő.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a felületen legalább 1000 különféle polipeptidet vagy oligonukleotidot állítunk elő egyenként legfeljebb mintegy 1 × 10<sup>-3</sup> cm<sup>2</sup> területű részfelületeken.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aminosavként L aminosavakat, D aminosavakat vagy szintetikus aminosavakat alkalmazunk.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kívánt polipeptid(ek) vagy oligonukleotid(ok) azonosításához a felületet egy receptorral érintkeztetjük, és a receptorhoz kötődő polipeptideket vagy oligonukleotidokat azonosítjuk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy receptorként antitestet alkalmazunk.

9. A 7 vagy 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a receptor radioaktív, fluoreszcens vagy más markert tartalmaz, és az azonosításhoz detektáljuk a marker helyét a hordozón.

10. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az azonosításhoz a polipeptid(ek)hez vagy oligonukleotid(ok)hoz receptort egy második receptorral érintkeztetjük, amely egy markert tartalmaz, és specifikusan kötődik a polipeptidhez vagy oligonukleotidhoz kötött receptorhoz.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hordozóként polimerizált Langmuir Blodgett filmet, funkcionizált üveget, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO<sub>2</sub>- vagy SiN<sub>4</sub>- alapú hordozót, módosított szilíciumot, (poli)tetrafluor-etilént, polisztirolt, (poli)vinilidén-difluoridot vagy ezek keverékét alkalmazzuk.

12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a funkció csoportokat kapcsolómolekulán keresztül megkötve tartalmazó hordozót alkalmazunk.

13. Az 1–12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy védőcsoportként nitroaromás csoportot alkalmazunk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy védőcsoportként orto-nitro-benzil-csoportot alkalmazunk.

15. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy védőcsoportként 6-nitro-*veratril*-oxi-karbonil-csoportot, 2-nitro-benzil-oxi-karbonil-csoportot, dimetil-dimetoxi-benzil-oxi-karbonil-csoportot, 5-bróm-7-nitro-indolinil-csoportot, o-hidroxi- $\alpha$ -metil-cinnamoil-csoportot, 2-oxi-metilén-antrakinon-csoportot vagy ezek kombinációját alkalmazzuk.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy védőcsoportként 6-nitro-*veratril*-oxi-karbonil-csoportot alkalmazunk.

17. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy védőcsoportként 2-nitro-benzil-oxi-karbonil-csoportot alkalmazunk.

18. Az 1–17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a besugárzást ultrabolya fényvel, látható fényvel, infravörös fényvel vagy ezek kombinációjával végezzük.

19. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a besugárzás során az alábbi lépéseket hajtjuk végre:

i) a hordozót egy litográfias maszkkal elfedjük, ahol a litográfias maszk egy adott hullámhosszúságú fény vonatkozásában lényegében átlátszó részfelületekből és lényegében átlátszatlan részfelületekből áll; és

ii) a maszkot legalább részben az adott hullámhosszúságú fényt sugárzó fényforrással világítjuk meg.

20. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy azt az alábbi elemeket tartalmazó berendezéssel valósítjuk meg:

(a) hordozó, melynek sugárzással eltávolítható védőcsoportokkal védett funkciós csoportokat tartalmazó felülete van, ahol a felület a védőcsoportok eltávolításával aktiválható,

(b) a felület meghatározott részfelületeinek besugárzására alkalmas eszköz,

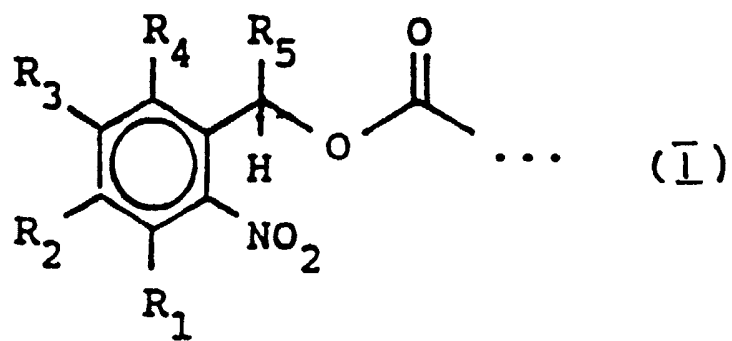
(c) a felület besugárzására alkalmas sugárforrás.

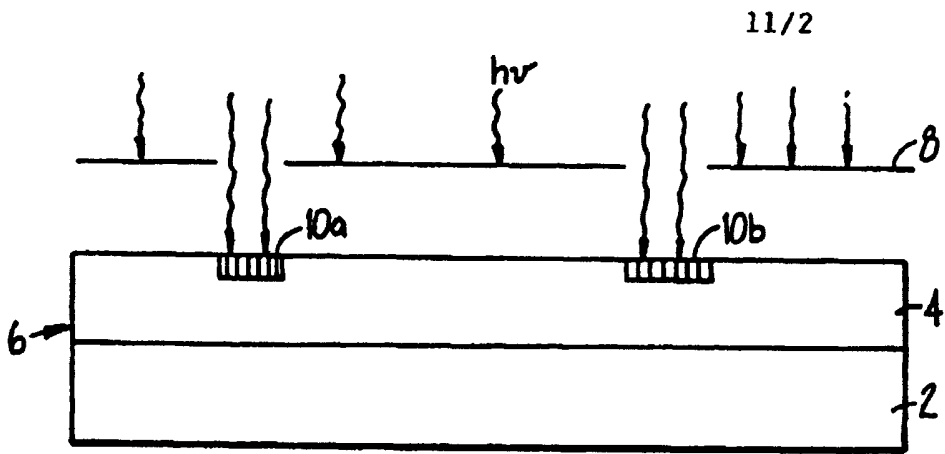
21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a berendezés legalább 100 polipeptid- vagy oli-

gonukleotidhelyet tartalmazó felülettel rendelkező hordozót tartalmaz.

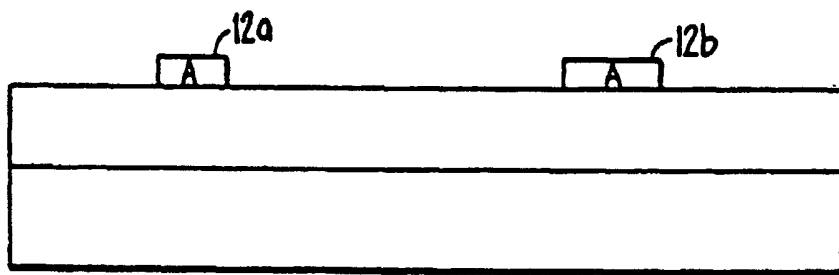
22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptid- vagy oligonukleotidhelyek mérete legfeljebb 0,1 cm<sup>2</sup>.

23. A 20–22. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a berendezés 11. igénypont szerinti hordozót tartalmaz.

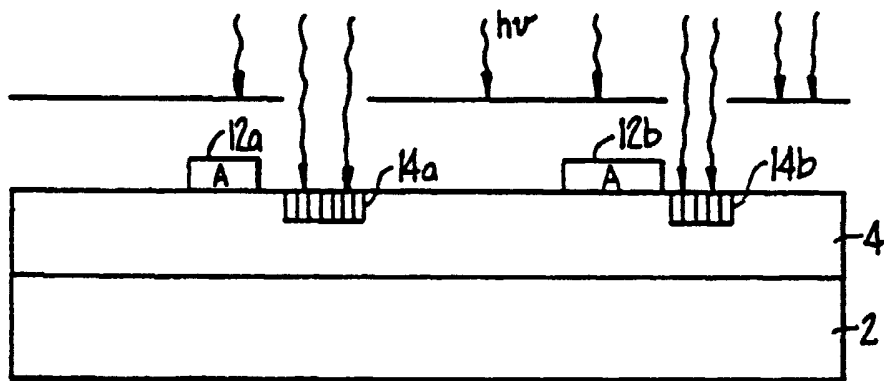




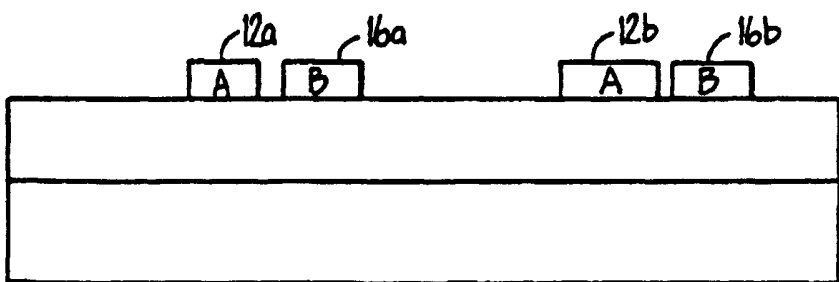
1. ábra



2. ábra

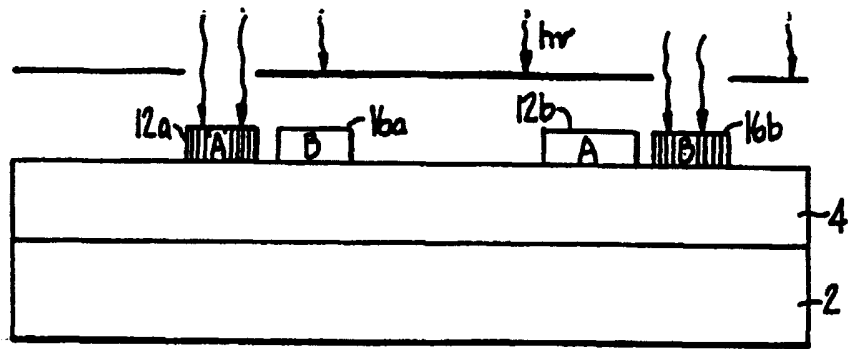


3. ábra

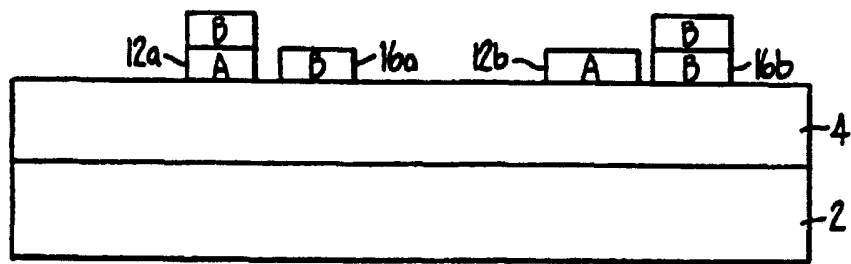


4. ábra

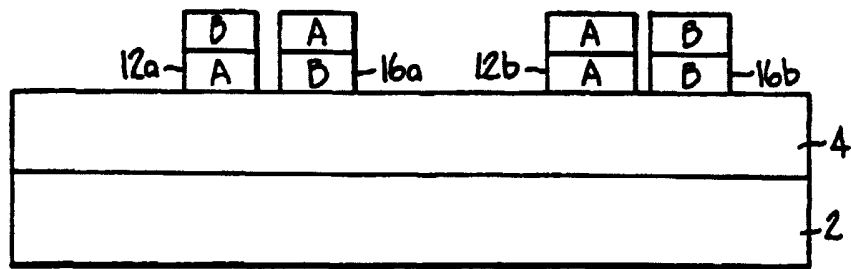




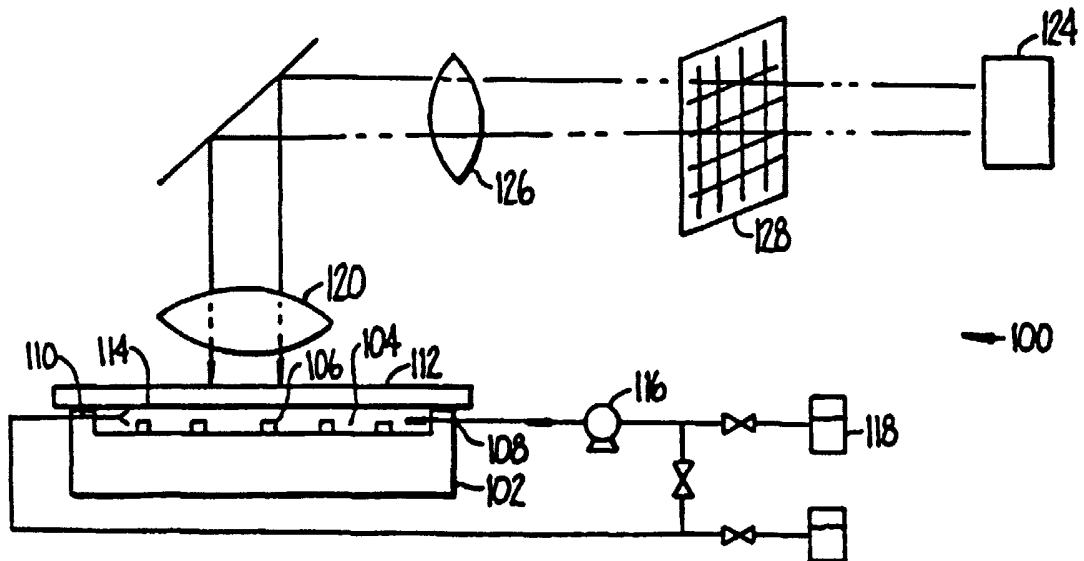
5. ábra



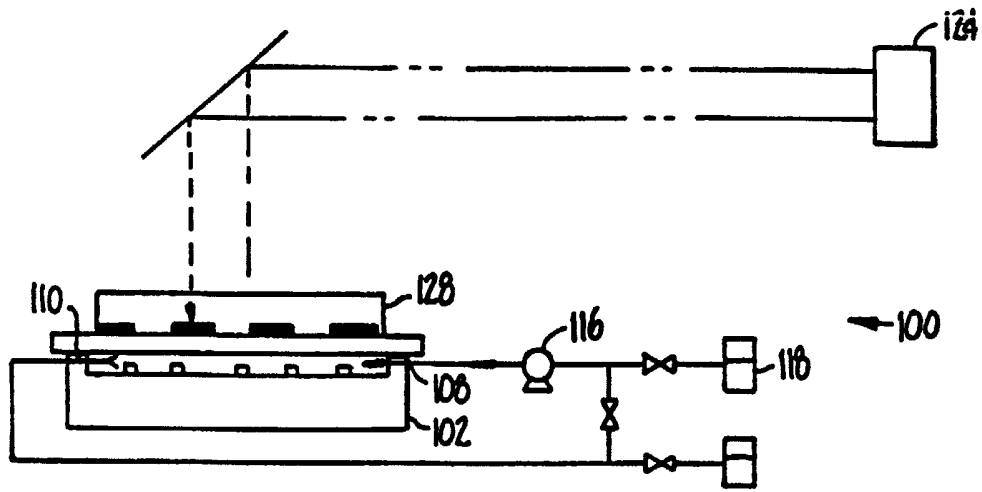
6. ábra



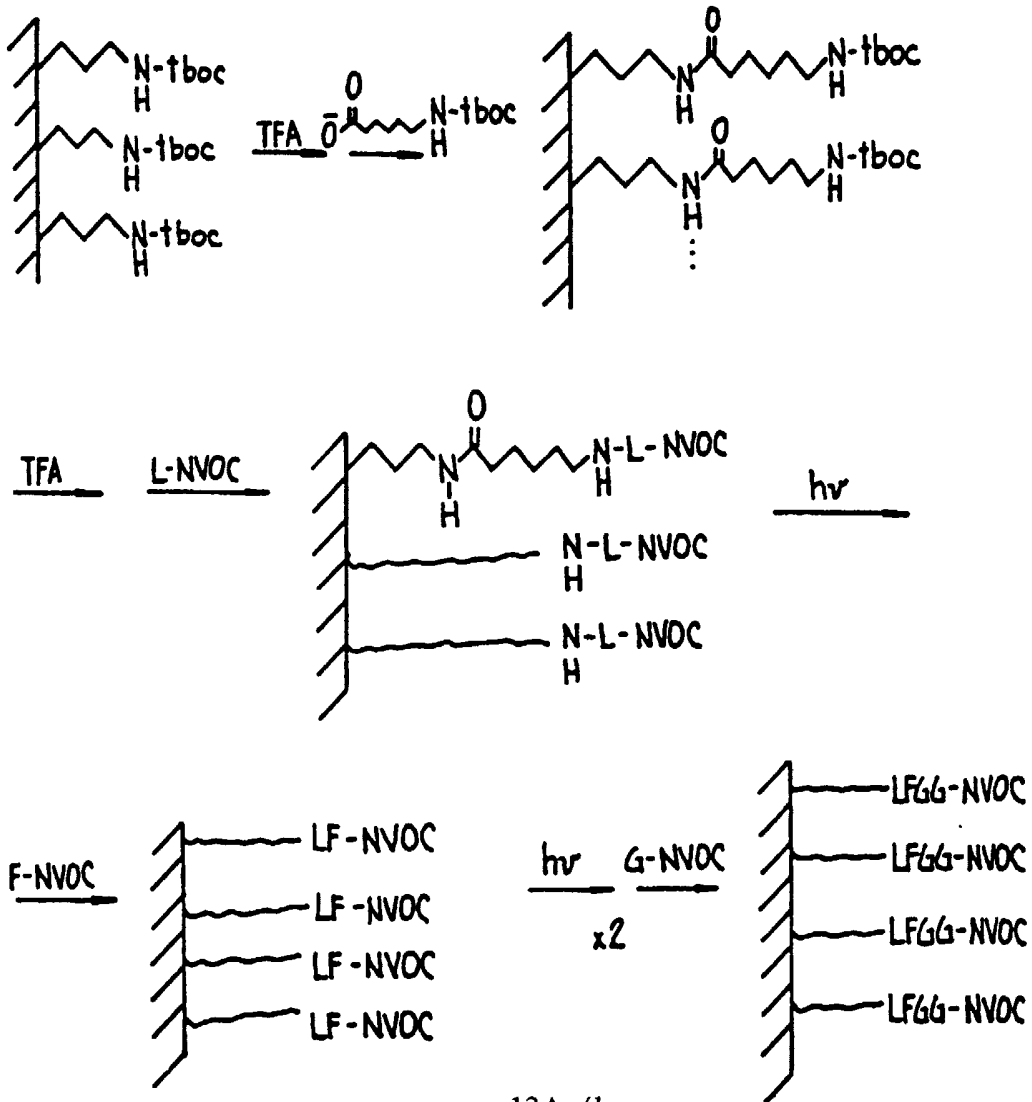
7. ábra



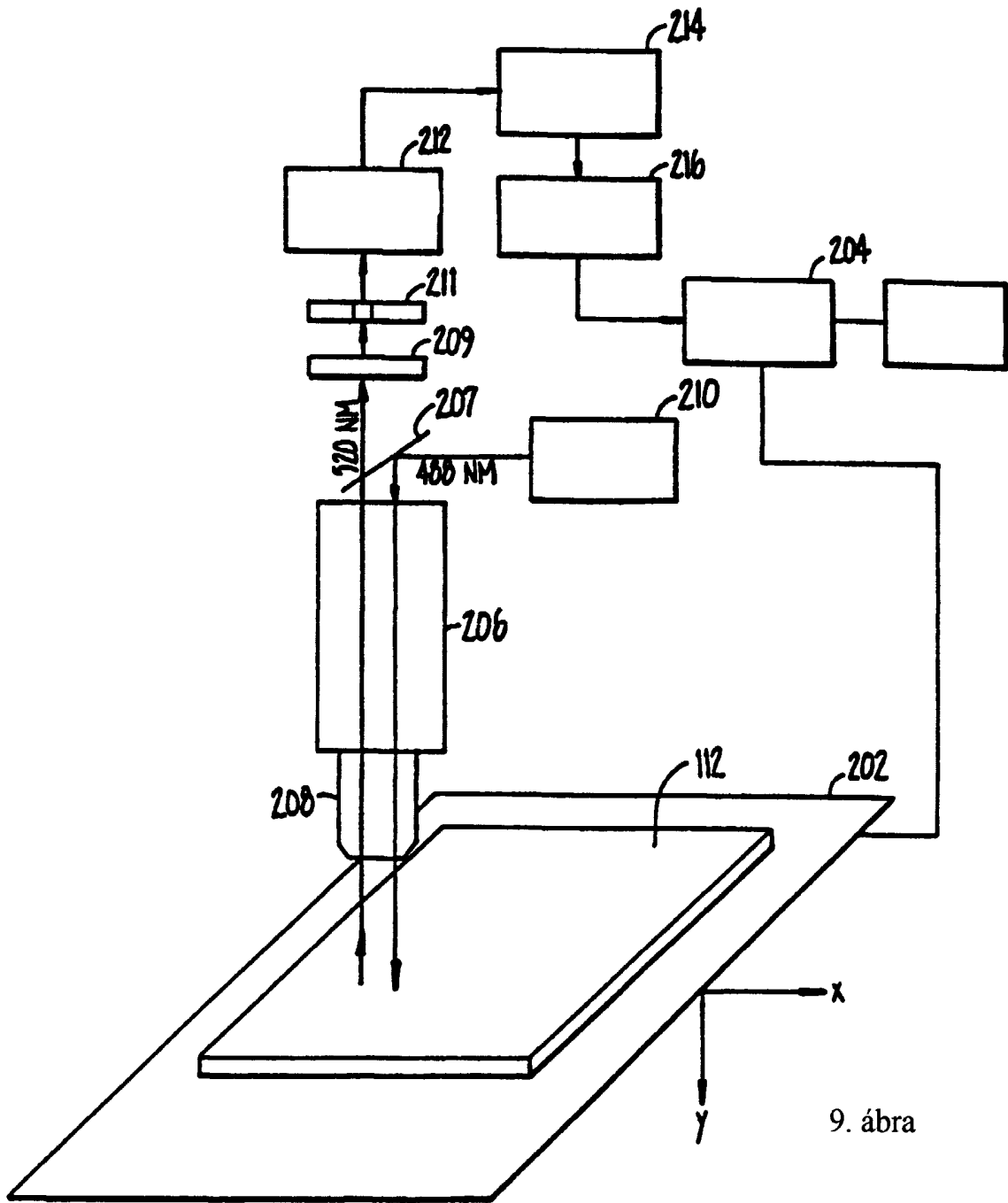
8a. ábra



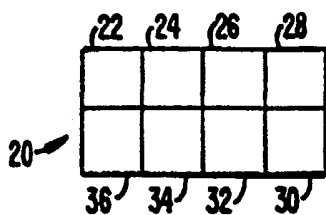
8b. ábra



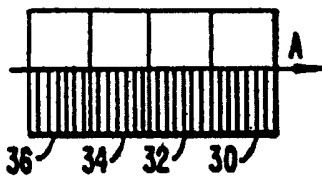
13A. ábra



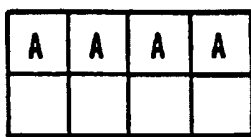
9. ábra



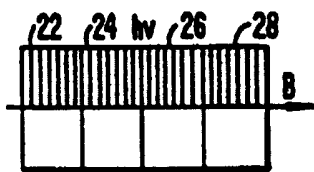
10A. ábra



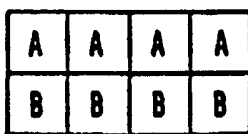
10B. ábra



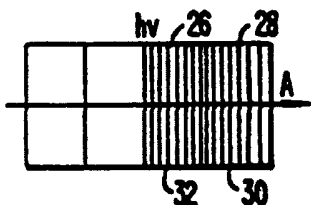
10C. ábra



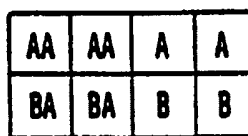
10D. ábra



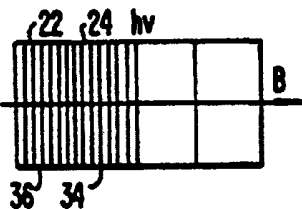
10E. ábra



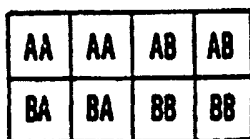
10F. ábra



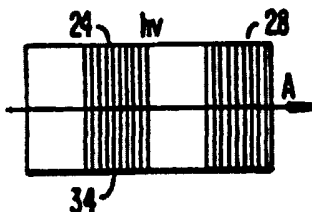
10G. ábra



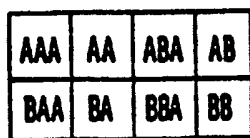
10H. ábra



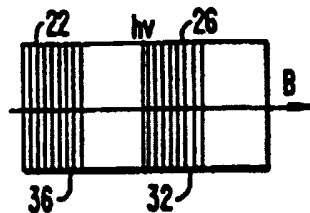
10I. ábra



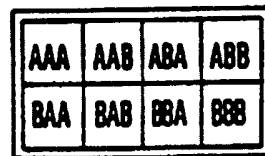
10J. ábra



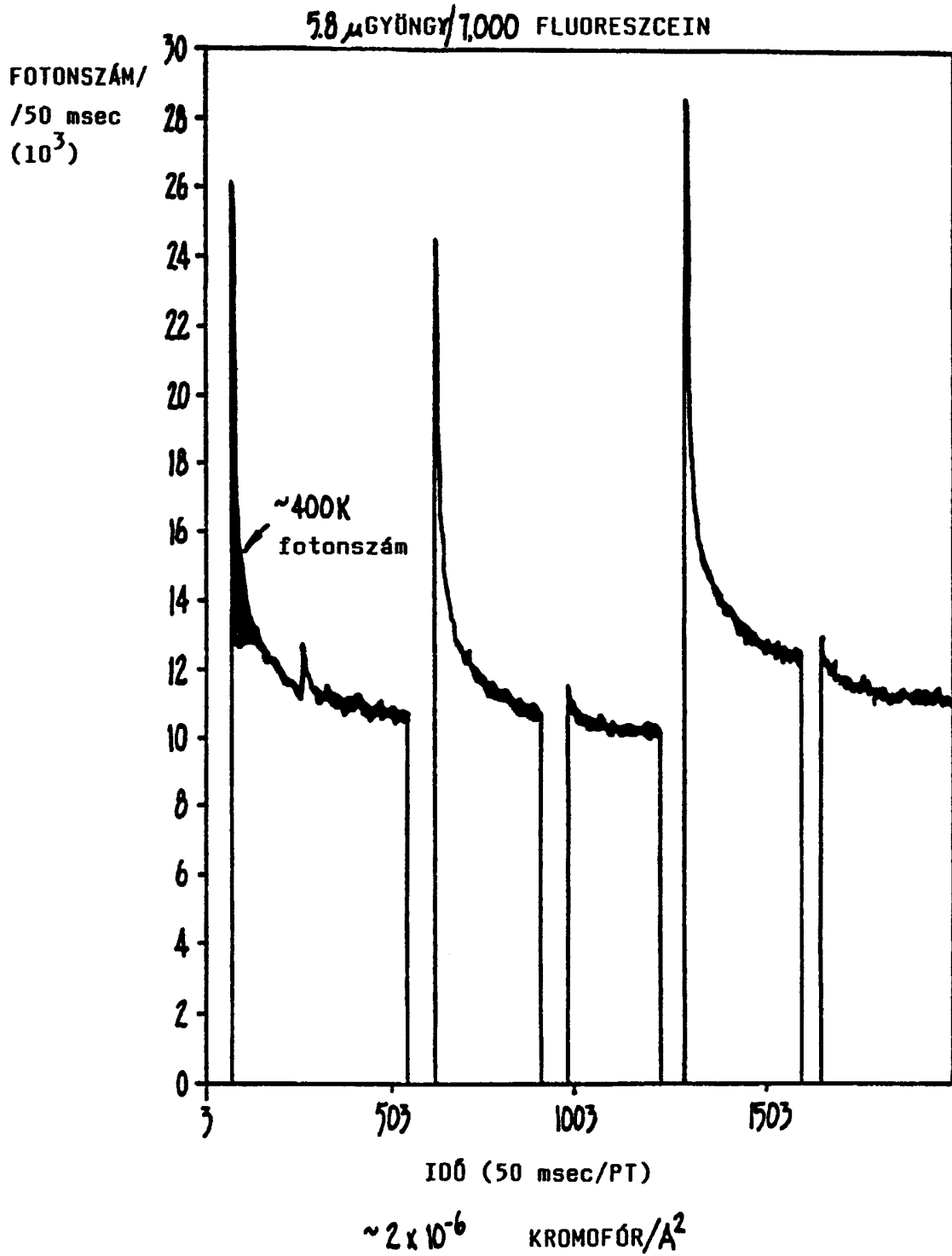
10K. ábra



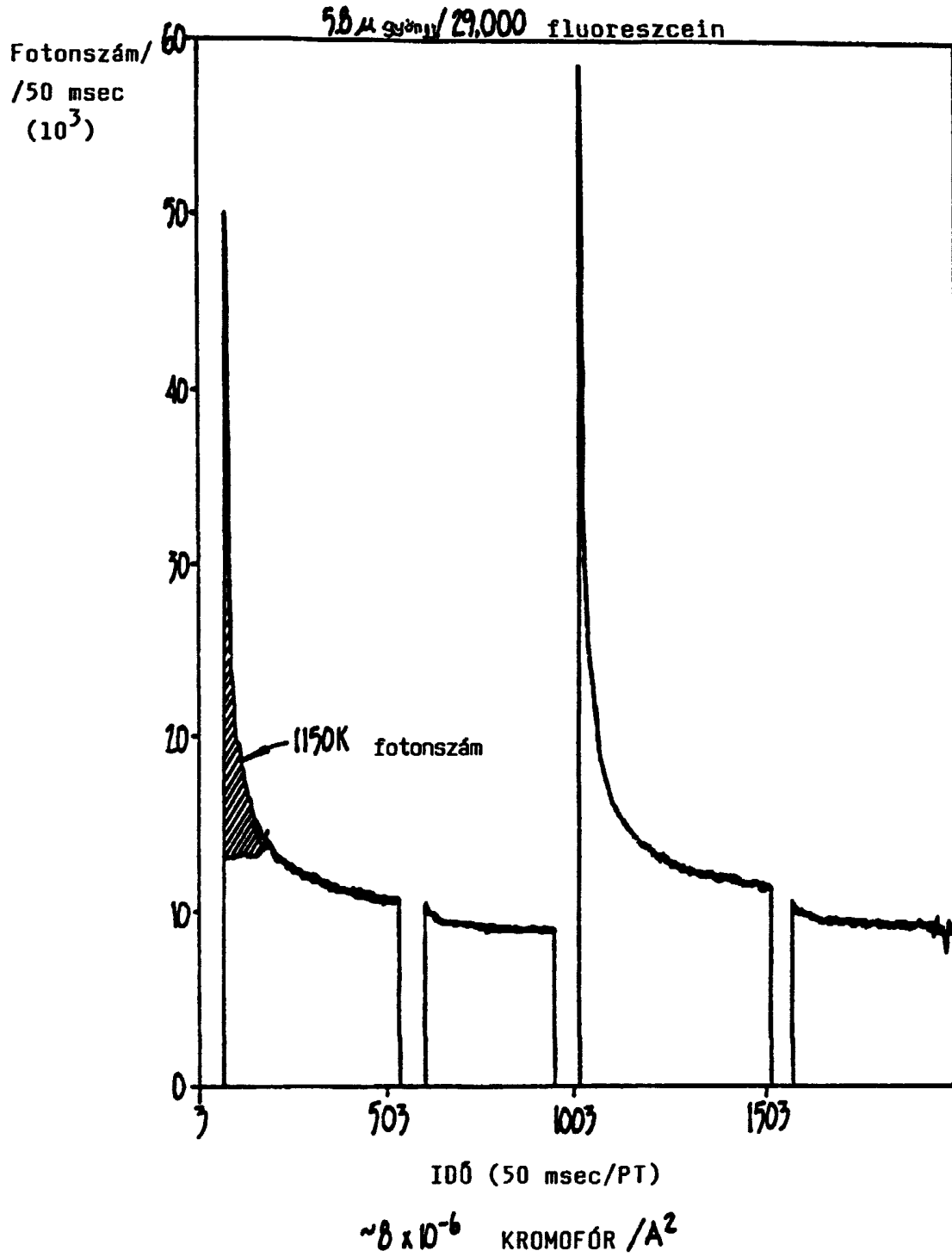
10L. ábra



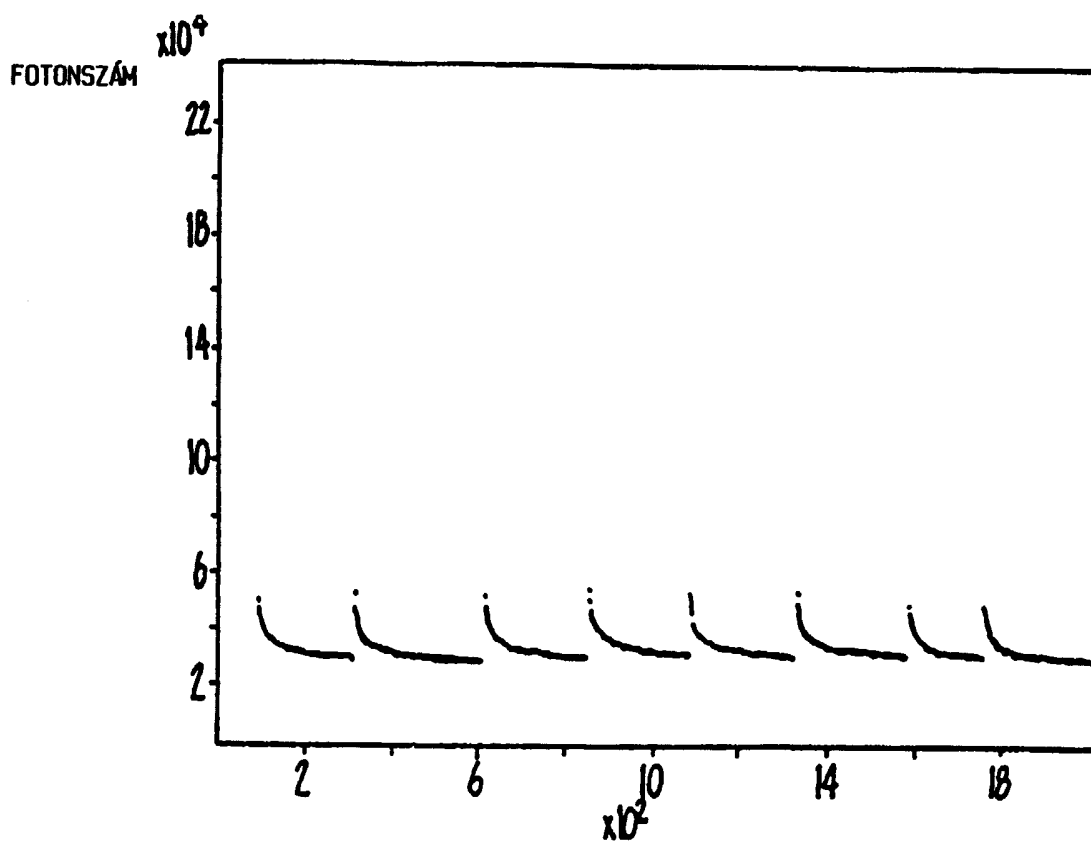
10M. ábra



11A. ábra

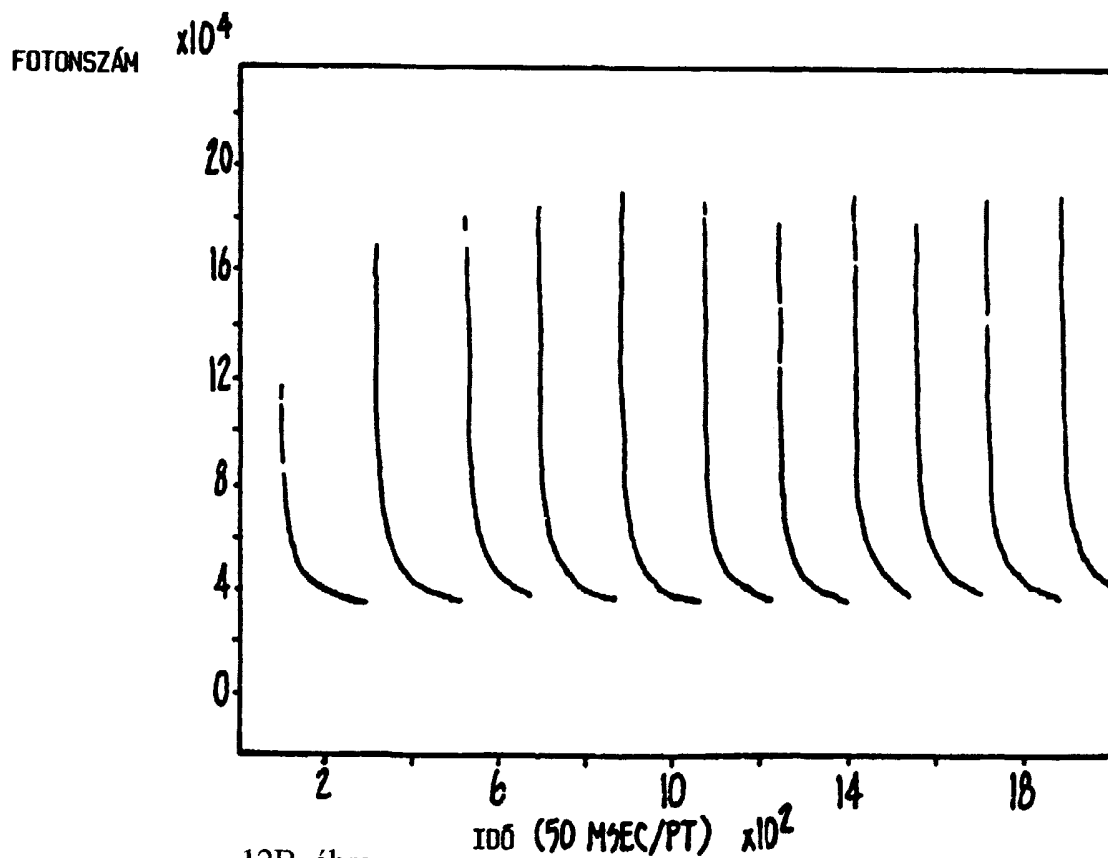


11B. ábra



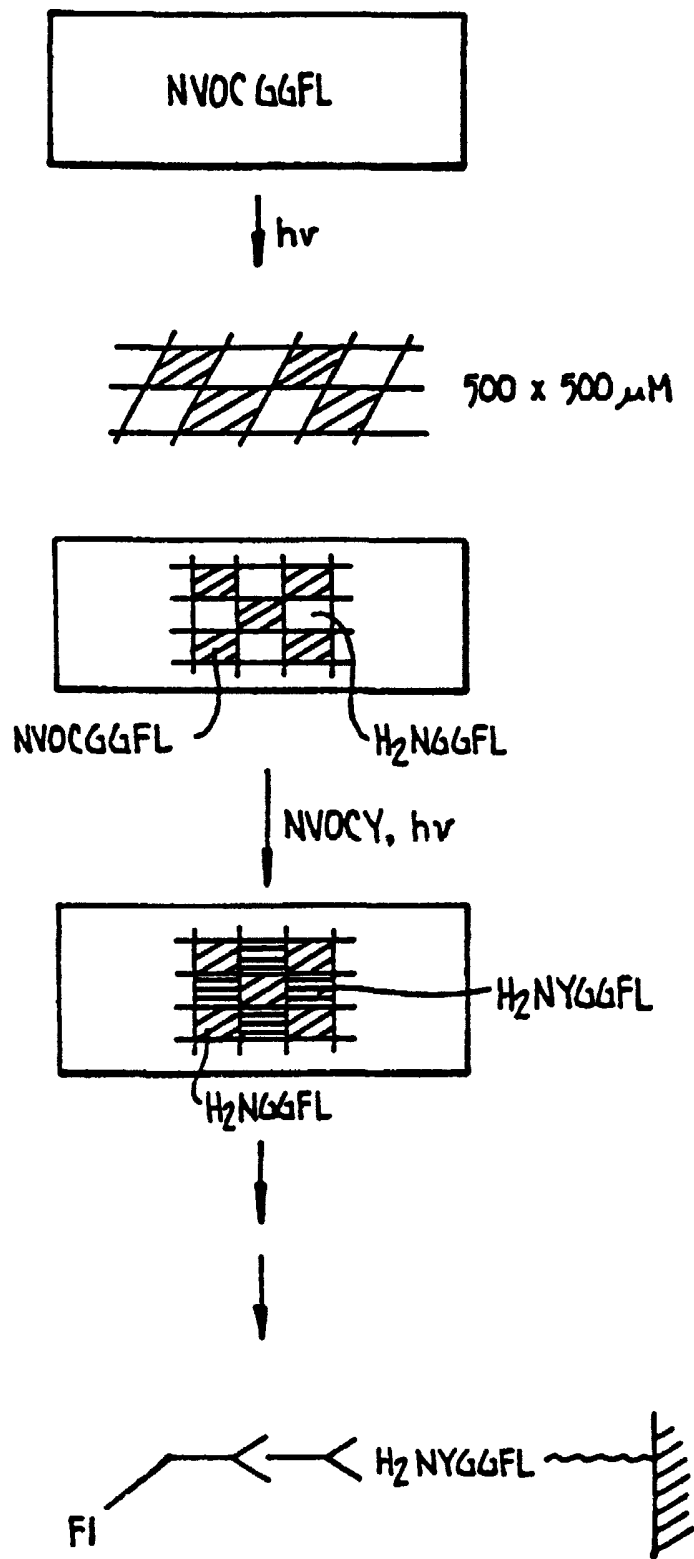
12A. ábra

IDŐ (50 MSEC/PT)



12B. ábra

IDŐ (50 MSEC/PT)  $\times 10^2$



13B. ábra



	P	A	S	G	
	<u>L</u> P <sub>G</sub> FL	<u>L</u> A <sub>G</sub> FL	<u>L</u> S <sub>G</sub> FL	<u>L</u> G <sub>G</sub> FL	L
	<u>F</u> P <sub>G</sub> FL	<u>F</u> A <sub>G</sub> FL	<u>F</u> S <sub>G</sub> FL	<u>F</u> G <sub>G</sub> FL	F
	<u>W</u> P <sub>G</sub> FL	<u>W</u> A <sub>G</sub> FL	<u>W</u> S <sub>G</sub> FL	<u>W</u> G <sub>G</sub> FL	W
	<u>Y</u> P <sub>G</sub> FL	<u>Y</u> A <sub>G</sub> FL	<u>Y</u> S <sub>G</sub> FL	<u>Y</u> G <sub>G</sub> FL	Y

L

14A. ábra

	p	a	s	G	
	<u>Y</u> p <sub>G</sub> FL	<u>Y</u> a <sub>G</sub> FL	<u>Y</u> s <sub>G</sub> FL	<u>Y</u> G <sub>G</sub> FL	Y
	<u>f</u> p <sub>G</sub> FL	<u>f</u> a <sub>G</sub> FL	<u>f</u> s <sub>G</sub> FL	<u>f</u> G <sub>G</sub> FL	f
	<u>w</u> p <sub>G</sub> FL	<u>w</u> a <sub>G</sub> FL	<u>w</u> s <sub>G</sub> FL	<u>w</u> G <sub>G</sub> FL	w
	<u>y</u> p <sub>G</sub> FL	<u>y</u> a <sub>G</sub> FL	<u>y</u> s <sub>G</sub> FL	<u>y</u> G <sub>G</sub> FL	y

D

14B. ábra